

Aspekte der Zellbiologie  
des archaeellen Wirt-Parasit-Systems  
*Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*:  
Zentrale Stoffwechselwege, Lipide, Histone.



**Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III –  
Biologie und vorklinische Medizin der Universität Regensburg

vorgelegt von  
**Ulrike Jahn**  
aus Thierhaupten

Regensburg, 2007

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. M. Thomm

Promotionsgesuch eingereicht am: 23.05.2007

Prüfungsausschuss:	Vorsitzender:	Prof. Dr. R. Wirth
	1. Gutachter:	Prof. Dr. M. Thomm
	2. Gutachter:	Prof. Dr. G. Fuchs
	3. Prüfer:	Prof. Dr. G. Hauska

<b>I. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>II. Material und Methoden .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Bezugsquellen von Substanzen</b>	
1.1. Chemikalien und Lösungsmittel.....	9
1.2. PCR-Primer .....	10
1.3. Enzyme, Plasmide und Reaktionskits .....	10
1.4. Antikörper .....	11
1.5. Isotopenmarkierte Substrate .....	11
<b>2. Medien</b>	
2.1. ½ SME-Medium (Stetter et al., 1983, modifiziert durch Huber et al., 2002)	
2.1.1. Zusammensetzung .....	11
2.1.2. Herstellung und Sterilisation.....	12
2.1.3. Herstellung und Sterilisation für Großanzuchten im Fermenter .....	12
2.2. LB-Medium (Miller, 1972)	
2.2.1. Bestandteile.....	13
2.2.2. Herstellung und Sterilisation.....	13
<b>3. Verwendete Organismen und Kultivierung</b>	
3.1. <i>I. hospitalis</i> bzw. Cokultur Kin4/M aus <i>I. hospitalis</i> und <i>N. equitans</i>	
3.1.1. Verwendete Stämme und Kultivierungsbedingungen.....	13
3.1.2. Erstellung von Wachstumskurven .....	13
3.1.3. Kultivierung in Serumflaschen .....	14
3.1.4. Kultivierung im Fermenter .....	14
3.1.5. Ernte nach Kultivierung im Fermenter .....	14
3.1.6. Gewinnung einer stark aufkonzentrierten <i>N. equitans</i> -Fraktion durch differentielle Zentrifugation .....	14
3.2. <i>E. coli</i>	
3.2.1. Verwendete Stämme und Kultivierungsbedingungen.....	15
3.2.2. Erstellung von Wachstumskurven .....	15
<b>4. Analyse von Proteinfractionen</b>	
4.1. Molekularmassenbestimmung von Proteinen.....	15
4.2. Western-Blot .....	15
4.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinfractionen .....	16

## 5. Untersuchung des Kohlenstoffmetabolismus in *I. hospitalis*

5.1 Kultivierung von <i>I. hospitalis</i> für analytische Untersuchungen	
5.1.1. Produktion von Zellmassen von <i>I. hospitalis</i> für enzymatische Analysen .....	17
5.1.2. Test zur Inkorporation organischer Substrate durch <i>I. hospitalis</i> .....	17
5.1.3. Produktion <sup>13</sup> C-markierter Zellmassen von <i>I. hospitalis</i> .....	18
5.2. Isolierung und Hydrolyse der Proteinfraction aus den <sup>13</sup> C-markierten Zellmassen ..	18
5.3. Auftrennung der Aminosäuren	
5.3.1. Abtrennung der positiv geladenen Aminosäuren .....	19
5.3.2. Abtrennung der sauren Aminosäuren .....	19
5.3.3. Auftrennung der neutralen Aminosäuren .....	20
5.3.4. Auftrennung von Phenylalanin und Tyrosin .....	20
5.4. NMR-Analyse der Aminosäuren .....	20
5.5. Enzymtests	
5.5.1. Zellaufschluss mit der Zelmühle .....	22
5.5.2. Enzymtests gekoppelt an die Reduktion/Oxidation von NAD(P) <sup>+</sup> /NAD(P)H .....	22
5.5.3. Enzymtests gekoppelt an die Reduktion/Oxidation von Methylviologen .....	23
5.5.4. Weitere photometrische Enzymtests .....	24
5.5.5. Enzymtests mit anschließender Phosphatbestimmung .....	24
5.5.6. Enzymtests gekoppelt an den Einbau <sup>14</sup> C-markierten Carbonats .....	26
5.6. Genomanalysen .....	27

## 6. Lipidanalyse

6.1 Lipidextraktion und Aufbereitung für gaschromatographische Analysen	
6.1.2. Reinigung der Gebrauchsmaterialien .....	28
6.1.3. Lipidextraktion .....	28
6.1.4. Entfernen des Schwefels aus den Lipidfraktionen .....	29
6.2. Aufbereitung der Kohlenwasserstoffketten .....	30
6.3. Aufbereitung der Zuckeranteile .....	30
6.4. Analyse der Kohlenwasserstoffketten und der Zucker .....	31
6.5. Analyse des δ <sup>13</sup> C-Gehalts der Kohlenwasserstoffe .....	31
6.6. Analyse der intakten polaren Lipide .....	32

## 7. Untersuchung der Histongene von *N. equitans*

7.1. Sequenzanalyse .....	33
7.2. DNA-Isolierung .....	33
7.3. Analyse von DNA-Fractionen	
7.3.1. Größenbestimmung von DNA-Fragmenten .....	33

7.3.2. Konzentrationsbestimmung von DNA-Fraktionen .....	34
7.4. Amplifikation und Aufreinigung der Histongene.....	34
7.5. Restriktion und Ligation von PCR-Produkt und pET16b .....	35
7.6. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	35
7.7. Transformation und Vervielfältigung der Fusionsplasmide.....	36
7.8. Plasmidisolierung und Kontrolle .....	36
7.9. Sequenzierung und Auswertung der Sequenzen .....	37
7.10. Expression in <i>E. coli</i> -Expressionsstämmen.....	37
7.11. Aufreinigen der rekombinanten Histone .....	37
7.12. Oligomerisierungsstudien.....	38
7.13. DNA-Binde- und Kompaktierungsstudien.....	38
 <b>III. Ergebnisse</b> .....	 39
 <b>1. Stoffwechselwege in <i>Ignicoccus hospitalis</i></b>	
1.1. Methodische Vorversuche: Inkorporation von organischen Substraten .....	39
1.2. CO <sub>2</sub> -Fixierung und zentraler Kohlenstoffmetabolismus	
1.2.1. Berechnung der erforderlichen spezifischen Aktivität CO <sub>2</sub> -fixierender Enzyme ...	43
1.2.2. Enzymaktivitäten in Zellextrakten von <i>I. hospitalis</i> -Zellen	
1.2.2.1. Aktivitäten von Schlüsselenzymen der bekannten CO <sub>2</sub> -Fixierungswege ...	43
1.2.2.2. Mögliche CO <sub>2</sub> -Fixierungsenzyme in <i>I. hospitalis</i> .....	45
1.2.2.3. Aktivitäten weiterer Enzyme des zentralen Kohlenstoffmetabolismus....	45
1.2.2.4. Biosynthetisches Potential, abgeleitet von den Enzymaktivitäten .....	48
1.2.3. Genomanalyse	
1.2.3.1. Gene für Enzyme des zentralen Kohlenstoffmetabolismus .....	48
1.2.3.2. Biosynthetisches Potential, abgeleitet von den Genomdaten.....	50
1.2.4. Retrobiosynthetische Analyse der <sup>13</sup> C-markierten Aminosäuren	
1.2.4.1. Abgeleitete <sup>13</sup> C-Markierungen von zentralen Metaboliten .....	51
1.2.4.2. Biosynthetisches Potential, abgeleitet von den <sup>13</sup> C-Markierungen .....	54
1.3. Kohlenhydratstoffwechsel	
1.3.1. Biosynthese von Kohlenhydraten	
1.3.1.1. Enzymaktivitäten in Zellextrakten von <i>I. hospitalis</i> -Zellen .....	56
1.3.1.2. Genomanalyse.....	57
1.3.1.3. Retrobiosynthetische Analyse des <sup>13</sup> C-markierten Histidins.....	59
1.3.2. Glycolyse .....	61

1.4. Biosynthesewege von Aminosäuren	
1.4.1. Biosynthese aromatischer Aminosäuren	
1.4.1.1. retrobiosynthetische Analyse der <sup>13</sup> C-markierten, aromatischen Aminosäuren.....	62
1.4.1.2. Genomanalyse .....	63
1.4.2. Biosynthese von Lysin	
1.4.2.1. retrobiosynthetische Analyse des <sup>13</sup> C-markierten Lysins .....	65
1.4.2.2. Genomanalyse.....	66
1.4.3. Biosynthese von Isoleucin	
1.4.3.1. retrobiosynthetische Analyse des <sup>13</sup> C-markierten Isoleucins.....	67
1.4.3.2. Genomanalyse .....	67
<b>2. Lipidzusammensetzung der Membranen von <i>I. hospitalis</i> und <i>N. equitans</i></b>	
2.1. Lipidertrag aus <i>N. equitans</i> und <i>I. hospitalis</i> -Zellen.....	69
2.2. Kohlenwasserstoffketten der Lipide .....	70
2.3. Intakte polare Lipide .....	74
<b>3. Histone von <i>N. equitans</i></b>	
3.1. Sequenzanalyse der Histogene (Neq288 und Neq348) von <i>N. equitans</i> .....	81
3.2. Herstellung und Aufreinigung rekombinanter Histone .....	82
3.3. Oligomerisierungsstudien mit rNEQ288 und rNEQ348 .....	84
3.4. DNA-Bindungs- und Kompaktierungsstudien mit rNEQ288 und rNEQ348 .....	85
<b>IV. Diskussion .....</b>	<b>87</b>
<b>1. Stoffwechselwege in <i>I. hospitalis</i> .....</b>	<b>87</b>
<b>2. Analyse der Membranlipide von <i>I. hospitalis</i> und <i>N. equitans</i> .....</b>	<b>94</b>
<b>3. Histone von <i>N. equitans</i> .....</b>	<b>97</b>
<b>V. Zusammenfassung .....</b>	<b>99</b>
<b>VI. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
<b>VII. Anhang .....</b>	<b>111</b>

## I. Einleitung

Symbiose ist laut Definition eine über einen langen Zeitraum hinweg bestehende Assoziation zwischen zwei unterschiedlichen Lebewesen, die in engem Kontakt zueinander stehen (Smith und Douglas, 1987). Solche Symbiosen beinhalten mutualistische Assoziationen, in denen beide Partner Nutzen aus der Symbiose ziehen, kommensale Assoziationen, in denen nur ein Partner einen Nutzen vom anderen hat, ohne diesen dabei zu schädigen, oder parasitische Assoziationen, in denen ein Partner unter Schädigung des anderen von diesem profitiert. Für viele Symbiosen ist eine genaue Zuordnung zu mutualistischen, kommensalen oder parasitischen Assoziationen jedoch nicht möglich.

Dies trifft auch auf die Cokultur aus *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans* zu (Huber et al., 2002, 2003). Die beiden Organismen wurden aus Sedimentproben eines Hydrothermalsystems im Bereich des Kolbeinsey-Rückens, nördlich von Island, isoliert. Bei beiden handelt es sich um hyperthermophile, strikt anaerobe Archaea. Sie bilden ein symbiotisches System, das – weitgehend oder vollständig – auf der Biosyntheseleistung des chemolithoautotrophen Wirtsorganismus *I. hospitalis* basiert. *N. equitans*-Zellen sind kleine Kokken, die sich auf der Oberfläche von *I. hospitalis*-Zellen anheften. Während *I. hospitalis* auch in Reinkultur wächst, kann *N. equitans* bislang nur in Gegenwart von *I. hospitalis* und nicht axenisch kultiviert werden. Auch gelang es nicht, *I. hospitalis* als Wirt durch die beiden anderen beschriebenen Vertreter der Gattung *Ignicoccus*, *I. pacificus* oder *I. islandicus* (Huber et al., 2000), zu ersetzen. Verschiedene entfernter verwandte Organismen wurden ebenfalls nicht als Wirt akzeptiert (Jahn, 2003; Paper, 2005). Über den Stoffwechsel von *N. equitans* oder die Interaktionen mit *I. hospitalis* ist sehr wenig bekannt. Im Genom von *N. equitans* fehlen nahezu alle bekannten Gene für biosynthetische Prozesse (Waters et al., 2003), was einen Vorteil für *I. hospitalis* durch die Aufnahme bestimmter Metaboliten aus *N. equitans* unwahrscheinlich macht. Auch physiologische Untersuchungen ließen den Schluss zu, dass es sich bei *N. equitans* um einen eher parasitischen Organismus handelt, der die Teilungsfähigkeit einer befallenen Wirtszelle einschränkt, sie aber nicht tötet und mit seinem Wirt *I. hospitalis* in stabiler Cokultur lebt (Jahn, 2003). Im natürlichen System kann ein Nutzen für *I. hospitalis* durch die Symbiose mit *N. equitans* jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Ähnliche Symbiosen sind bislang nicht bekannt. Die Cokultur aus *I. hospitalis* und *N. equitans* stellt sowohl das einzig bekannte rein archaeelle als auch das einzig bekannte hyperthermophile symbiotische System dar. Beide an diesem System beteiligten Organismen sind nicht nur wegen ihrer einzigartigen Lebensgemeinschaft von Interesse, sondern zeigen zahlreiche weitere Besonderheiten.

*N. equitans* weist neben einer äußerst geringen Zellgröße von etwa 350-500 nm Durchmesser (Huber et al., 2002) mit nur 490885 bp das kleinste bekannte archaeele Genom (Waters et al., 2003) und eines der kleinsten Genome überhaupt auf. Kleine Zellgrößen und reduzierte Genome sind für viele symbiotische oder parasitische Bacteria charakteristisch (Ochman et al., 2001). Da im Genom von *N. equitans* fast keine Gene für Biosyntheseenzyme annotiert werden können, ist es sehr wahrscheinlich, dass *N. equitans* nahezu alle Zellbausteine wie Lipide, Zucker oder Aminosäuren von seinem Wirt bezieht. Im Gegensatz zu Genen für biosynthetische Prozesse wurden alle Komponenten der Informationsprozessierung (DNA-Replikation, Transkription und Translation, sowie Reparatursysteme) und zur Durchführung eines Zellzyklus annotiert. Zudem wurden zwei Gene, die vermutlich für Histone kodieren, im Genom nachgewiesen. Eine weitere Besonderheit ist die große Zahl gespaltener Gene im Genom von *N. equitans* (Waters et al., 2003, Randau et al., 2005a). Dass diese Gene für funktionelle tRNAs oder Enzyme kodieren können, wurde im Falle von vier gespaltenen tRNAs und der gespaltenen DNA-Polymerase gezeigt (Randau et al., 2005a, 2005b; Choi et al., 2006). Die phylogenetische Position von *N. equitans* ist nicht vollständig geklärt. Aufgrund der 16S-rRNA-Gensequenz wurde es als der einzige kultivierte Vertreter eines neuen Reiches der Nanoarchaeota (Huber et al., 2002) beschrieben. Je nach Berechnungsmethode oder verwendeten Gensequenzen wurde diese Einteilung später bestätigt (Waters et al., 2003), oder *N. equitans* wurde den Crenarchaeota (Ciccarelli et al., 2006) oder den Euryarchaeota (Brochier et al., 2005) zugeordnet. Für eine sichere Zuordnung dieser Organismengruppe erscheint eine Kultivierung und Charakterisierung weiterer "Nanoarchaeen" unabdingbar. Verwandte 16S-rRNA-Sequenzen wurden bereits aus verschiedenen Biotopen erhalten (Hohn et al., 2002; McCliment et al., 2006), eine Kultivierung der Organismen ist bislang jedoch nicht gelungen.

Der Wirtsorganismus *I. hospitalis* ist eine kürzlich beschriebene Art der Desulfurococcales (Paper et al., 2007), die eine Ordnung im archaeele Reich Crenarchaeota darstellen. Wie die beiden anderen beschriebenen *Ignicoccus*-Arten, *I. islandicus* und *I. pacificus* (Huber et al., 2000), ist *I. hospitalis* ein strikt anaerobes, chemolithoautotrophes Archaeum mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 90 °C. Als einzige bekannte Energiequelle dient die Reduktion von elementarem Schwefel mit molekularem Wasserstoff, als obligate Kohlenstoffquelle CO<sub>2</sub>. Erste Untersuchungen an *I. islandicus* und *I. pacificus* lassen vermuten, dass die Gattung *Ignicoccus* keinen der bekannten CO<sub>2</sub>-Fixierungswege nutzt (Hügler et al., 2003). Eine weitere Besonderheit der Gattung *Ignicoccus* ist die einzigartige Ultrastruktur. Im Gegensatz zu allen anderen bekannten Archaea weist die Gattung *Ignicoccus* eine äußere Membran als Zellhülle auf (Rachel et al., 2002). Diese äußere Membran unterscheidet sich in ihrer Lipid- und Proteinzusammensetzung deutlich von der äußeren Membran Gram-negativer Bacteria (Näther und Rachel, 2004; Burghardt et al., 2007). Sie umschließt einen periplasmatischen Raum variabler Größe, in dem Vesikel



beobachtet werden, die sich aus der Cytoplasmamembran abzuschnüren scheinen (Rachel et al., 2002). Das Genom von *I. hospitalis* ist mit einer Größe von ca. 1,3 Mbp unter den bekannten archaeellen Genomen das zweitkleinste, und das kleinste aller eigenständig lebenden Archaeen. Die Genomsequenz und -Annotierung ist auf der Homepage des DOE Joint Genome Institutes verfügbar ([http://genome.jgi.psf.org/draft\\_microbes/ign\\_k/ign\\_k.draft.html](http://genome.jgi.psf.org/draft_microbes/ign_k/ign_k.draft.html)). Bisher wurden nur 1434 Gene annotiert, was auf eine hohe metabolische Spezialisierung von *I. hospitalis* schließen lässt.

### **Biosynthetische Prozesse in *I. hospitalis***

Die Genomanalyse von *N. equitans* ließ den Schluss zu, dass alle primären biosynthetischen Prozesse innerhalb des Organismensystems von *I. hospitalis* vollzogen werden. Ein Schlüssel zum Verständnis der Physiologie von *N. equitans* liegt also im Verständnis der Physiologie von *I. hospitalis*. Allerdings ist auch über den Metabolismus autotropher Desulfurococcales bisher sehr wenig bekannt (Hügler et al., 2003). In dieser Arbeit wurden deswegen verschiedene primäre Biosynthesewege – CO<sub>2</sub>-Fixierung, Biosynthese zentraler Kohlenstoffmetaboliten wie Pyruvat, Oxalacetat, oder 2-Oxoglutarat, sowie die Biosynthese von Zuckern und Aminosäuren – in *I. hospitalis* einer genauen Untersuchung unterzogen.

#### CO<sub>2</sub>-Fixierung

Bisher sind vier CO<sub>2</sub>-Fixierungswege bekannt: Der Calvin-Zyklus, der reduktive Acetyl-CoA-Weg, der reduktive Citrat-Zyklus und der 3-Hydroxypropionat-Zyklus.

Unter diesen CO<sub>2</sub>-Fixierungswegen hat der Calvin-Zyklus aufgrund seines Vorkommens in allen grünen Pflanzen, Algen und Cyanobacteria die größte ökologische Relevanz. Er wurde als erster CO<sub>2</sub>-Fixierungsweg beschrieben (Bascham und Calvin, 1962) und bei allen autotrophen Eukaryota und den meisten aeroben und fakultativ aeroben Bacteria nachgewiesen (Madigan und Martinko, 2006). Das Schlüsselenzym des Calvin-Zyklus ist die Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO), die die Carboxylierung von Ribulose-1,5-Bisphosphat katalysiert und daraus zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat synthetisiert. In allen untersuchten autotrophen Archaea werden andere Wege zur CO<sub>2</sub>-Fixierung verwendet. Zwar wurde in einigen Archaea im Genom oder in Enzymtests eine RubisCO nachgewiesen (Rajagopalan und Alteka, 1994; Bult et al., 1996; Klenk et al., 1997; Ezaki et al., 1999), jedoch weisen diese Archaea entweder keine autotrophe Lebensweise auf, oder nutzen einen anderen Weg zur CO<sub>2</sub>-Fixierung. Kürzlich wurde vorgeschlagen, dass die RubisCO in diesen Archaea am Adenosin-Monophosphat(AMP)-Abbau beteiligt ist und zur Synthese von zwei Molekülen 3-Phosphoglycerat aus der Pentose des AMPs führt. Viele Archaea nutzen Adenosin-Diphosphat (ADP) statt Adenosin-Triphosphat (ATP) abhängige Kinasen in der Glycolyse, wodurch eine hohe intrazelluläre AMP-Konzentration entsteht.

AMP-Abbau könnte betrieben werden, um diese zu verringern, oder um bei Energiemangel ATP aus dem Produkt 3-Phosphoglycerat zu gewinnen (Sato et al., 2007).

Der reduktive Acetyl-CoA-Weg ist aufgrund seines Vorkommens in autotrophen Methanogenen ebenfalls von hoher ökologischer Relevanz. Dieser Weg ist der einzig beschriebene nicht-zyklische Weg zur CO<sub>2</sub>-Fixierung. Charakteristische Enzyme dieses Weges sind die CO-Dehydrogenase (Acetyl-CoA-Synthase) und die Formiat-Dehydrogenase (Ragsdale, 1991; Wood, 1991), die ausgehend von zwei Molekülen CO<sub>2</sub> die Synthese von Acetyl-CoA katalysieren. Aufgrund der Sauerstoffempfindlichkeit der CO-Dehydrogenase und anderer beteiligter Enzyme ist dieser Weg nur bei strikt anaeroben Mikroorganismen zu finden. Zuerst entdeckt wurde er bei homoacetogenen Bacteria (Ljungdahl et al., 1965; Ljungdahl, 1986; Eden und Fuchs, 1983; Fuchs, 1986). Später wurde er auch bei anaeroben, Sulfat-reduzierenden oder Ammonium-oxidierenden Bacteria nachgewiesen (Thauer et al., 1989; White, 1995). Innerhalb der Archaea wird dieser Weg von den methanogenen Euryarchaeota (Madigan und Martinko, 2006) und ihren engen Verwandten, den Archaeoglobales (Vorholt et al., 1995, 1997), genutzt.

Eine weitere Möglichkeit zur CO<sub>2</sub>-Fixierung ist der reduktive Citrat-Zyklus (Evans et al., 1966). Dieser Zyklus ermöglicht durch eine Umkehrung der Reaktionen des Citrat-Zyklus die Fixierung von zwei Molekülen CO<sub>2</sub> zu einem Molekül Acetyl-CoA. Acetyl-CoA wird in einem weiteren CO<sub>2</sub>-Fixierungsschritt zu Pyruvat carboxyliert. Im Citrat-Zyklus treten zwei Enzyme auf, die irreversible Reaktionen katalysieren (Citrat-Synthase, 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase). Diese werden im reduktiven Citrat-Zyklus durch die ATP-Citrat-Lyase und die 2-Oxoglutarat:Ferredoxin-Oxidoreduktase ersetzt (Ivanovsky et al., 1980; Antranikian et al., 1982). Zusammen mit der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, welche die reduktive Carboxylierung des Acetyl-CoAs katalysiert, stellen diese Enzyme Schlüsselenzyme des reduktiven Citrat-Zyklus dar. Die beteiligten Enzyme können trotz des sauerstoffempfindlichen Cofaktors Ferredoxin geringe Sauerstoffkonzentrationen tolerieren, weswegen dieser Weg nicht nur von anaeroben, sondern auch von mikroaerophilen Organismen genutzt wird. Der reduktive Citrat-Zyklus wurde bei einer Reihe anaerober oder mikroaerophiler Bacteria nachgewiesen (Fuchs et al., 1980; Schauder et al., 1987), unter denen sich auch extrem thermophile Vertreter befinden (Shiba et al., 1985; Beh et al., 1993). Unter den Archaea ist er bisher auf Vertreter der Thermoproteales (Crenarchaeota) beschränkt (Beh et al., 1993; Hügler et al., 2003).

Der vierte CO<sub>2</sub>-Fixierungsweg ist der 3-Hydroxypropionat-Zyklus (Strauss und Fuchs, 1993; Herter et al., 2001). Dieser Zyklus wurde an *Chloroflexus aurantiacus* erforscht, eine modifizierte Version wird aber offensichtlich auch von Crenarchaeota der Ordnung Sulfolobales genutzt (Hügler et al., 2003; Alber et al., 2006). Der 3-Hydroxypropionat-Zyklus ist ein komplexes, biziyklisches System, in welchem Glyoxylat als erstes CO<sub>2</sub>-

Fixierungsprodukt entsteht. Insgesamt werden in diesem Bizeyklus drei Moleküle CO<sub>2</sub> fixiert und Pyruvat als Vorstufe weiterer Biosynthesewege gebildet. Charakteristische Enzyme sind die Propionyl-CoA-Synthase (Alber und Fuchs, 2002), die Malonyl-CoA-Reduktase (Hügler et al., 2002) und die Acetyl-CoA/Propionyl-CoA-Carboxylase (Hügler et al., 2003).

Bei enzymatischen Untersuchungen waren in Zellextrakten von *I. pacificus* und *I. islandicus* die Schlüsselenzyme dieser vier CO<sub>2</sub>-Fixierungswege nicht aktiv. Es wurde lediglich die Aktivität der Pyruvat:Akzeptor-Oxidoreduktase, eines der drei Schlüsselenzyme des reduktiven Citrat-Zyklus, nachgewiesen (Hügler et al., 2003).

### Biosynthese von Kohlenhydraten

Im Gegensatz zur CO<sub>2</sub>-Fixierung ist die Gluconeogenese ein Prozess, der in allen bekannten Organismen der drei Domänen Eukarya, Bacteria und Archaea über fast identische Reaktionen verläuft. Alle daraufhin untersuchten Organismen nutzen zur Synthese von Glucose- oder Fructosephosphat die reversiblen Reaktionen des Embden-Meyerhoff-Wegs, was darauf schließen lässt, dass es sich dabei um einen sehr ursprünglichen Weg handelt (Ronimus und Morgan, 2003). Die irreversiblen Reaktionen des Embden-Meyerhoff-Wegs (katalysiert durch Phosphofructo-Kinase und Pyruvat-Kinase) werden durch die Enzyme Fructose-1,6-Bisphosphatase und Phosphoenolpyruvat(PEP)-Synthetase umgekehrt (Siebers und Schönheit, 2005). Die Gluconeogenese der Archaea weist Unterschiede zur Gluconeogenese in Bacteria und Eukarya auf; diese zeigen sich in der Natur der beteiligten Enzyme und ihrer Cofaktoren (Verhees et al., 2003; Siebers und Schönheit, 2005). Ein wichtiger Unterschied besteht in der Synthese von Glycerinaldehyd-3-Phosphat aus 3-Phosphoglycerat. Bacteria und Eukaryota nutzen dazu die reversiblen Reaktionen der phosphorylierenden, NAD(P)<sup>+</sup>-abhängigen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase in Kombination mit der Phosphoglycerat-Kinase. Diese beiden Enzyme werden von Archaea überwiegend in der Gluconeogenese verwendet, weswegen sie bei Archaea als charakteristisch für die Gluconeogenese angesehen werden können (Siebers und Schönheit, 2005). Lediglich halophile Archaea nutzen sie auch in der Glycolyse. Alle anderen bisher untersuchten Archaea nutzen zur Glycolyse die nicht phosphorylierende, NAD(P)<sup>+</sup>-abhängige Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase oder die Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin-Oxidoreduktase (Verhees et al., 2003; Siebers und Schönheit, 2005).

Die Biosynthese von Pentosen, essentiellen Bausteinen der Nukleinsäuren, ist in Archaea noch weitgehend ungeklärt. Bisher wurden drei mögliche Wege zur Pentosephosphat-Biosynthese beschrieben: der oxidative Pentosephosphat-Weg, der nicht-oxidative Pentosephosphat-Weg und der Ribulose-Monophosphat-Weg. Der oxidative Pentosephosphat-Weg ist hauptsächlich auf die Domäne der Bacteria beschränkt, wurde jedoch auch bei mehreren methanogenen Archaea entdeckt (Ekiel et al., 1983; Eisenreich et al., 1991; Choquet et al., 1994). Der nicht oxidative Pentosephosphat-Weg wurde in

mehreren methanogenen Archaea durch enzymatische Analysen (Yu et al., 1994), genomische Analysen (Selkov et al., 1997) und Isotopenmarkierungsstudien (Choquet et al., 1994; Tumbula et al., 1997) nachgewiesen. Für Archaea, denen die Gene für den nicht oxidativen oder den oxidativen Pentosephosphat-Weg fehlen, wurde kürzlich auf der Basis genomischer Analysen der Ribulose-Monophosphat-Weg als Alternative für die Pentosephosphat-Biosynthese vorgeschlagen (Soderberg, 2005; Goenrich et al., 2005; Kato et al., 2006). Zuvor wurde davon ausgegangen, dass dieser Weg ausschließlich in entgegengesetzter Richtung zur Fixierung von Formaldehyd von methylo trophen Bacteria genutzt wird (Vorholt, 2002; Yurimoto et al., 2005). Im Ribulose-Monophosphat-Weg würde die Biosynthese von Pentosephosphat über eine Abspaltung von Formaldehyd von Hexulose-Monophosphat erfolgen. Die hierfür benötigten Enzyme, die 3-Hexulose-6-Phosphat-Synthase und die 3-Hexulose-6-Phosphat-Isomerase, sind im Genom verschiedener Archaea zu finden.

### Biosynthese von Aminosäuren

Ungefähr 50 % des Kohlenstoffs einer Zelle befinden sich in ihren Aminosäuren. Ihre Synthese verläuft in der Regel über 2-Oxosäuren, die über Transaminierung die Aminogruppe aus Glutamat erhalten. Die Biosynthese von Histidin erfolgt über ein davon abweichendes Prinzip aus Pentosephosphat (Fuchs, 2006). Bis auf wenige Ausnahmen werden in den Organismen aller drei Domänen zur Biosynthese der Aminosäuren die gleichen Biosynthesewege genutzt. Zu den Ausnahmen zählt die Synthese von aromatischen Aminosäuren, sowie von Lysin und Isoleucin. Für diese Aminosäuren sind je zwei alternative Biosynthesewege bekannt. Aromatische Aminosäuren können über den Shikimat-Weg oder den L-Aspartat-Semialdehyd-Weg (White, 2004) synthetisiert werden. Die Synthese von Lysin kann über den Diaminopimelat-Weg (Vogel, 1965) oder den 2-Aminoadipat-Weg (Bhattacharjee, 1985) erfolgen. Für die Synthese des Isoleucins sind der konventionelle Weg aus Threonin (Umbarger et al., 1978) oder der Citramalat-Weg (Charon et al., 1974) beschrieben.

### Membranlipide von *I. hospitalis* und *N. equitans*

Die Genomanalyse von *N. equitans* (Waters et al., 2003) ließ vermuten, dass alle Zellbausteine von *N. equitans* von seinem Wirt *I. hospitalis* stammen. Eine vergleichende Analyse der Membranlipide von *N. equitans* und *I. hospitalis* sollte überprüfen, ob diese Vermutung für die Membranlipide zutrifft. Des Weiteren sollte der Einfluss verschiedener Kultivierungstemperaturen auf die Lipidzusammensetzung der Membranen von *I. hospitalis* bestimmt und nach möglichen Lipid-Biomarkern für beide Organismen gesucht werden. Die

in dieser Arbeit erfolgten Analysen bauen auf methodischen Vorversuchen, die im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt wurden (Jahn, 2003), auf.

Die Zusammensetzung der Cytoplasmamembran ist ein Charakteristikum, durch das Archaea deutlich von den beiden anderen Domänen, den Bacteria und den Eukarya, unterschieden werden können. Die Membranen von Bacteria und Eukarya enthalten Esterlipide. Diese entstehen durch die Verknüpfung von Glycerin mit Fettsäuren aus Polymethylen-Kohlenwasserstoffketten. Archaeelle Membranen enthalten Lipide aus Isoprenoid-Kohlenwasserstoffketten, die über Etherbindungen an Glycerin gebunden sind (Langworthy 1985; DeRosa und Gambacorta 1988). Zudem enthalten die Glycerin-Etherlipide von Archaea 2,3-sn-Glycerin, wohingegen die Glycerin-Esterlipide von Eukarya und Bacteria eine 1,2-sn-Stereochemie aufweisen (DeRosa et al., 1991). Aufgrund der Unterschiede werden archaeelle Lipide als spezifische Biomarker verwendet, um unabhängig von molekulargenetischen Methoden Archaea in bestimmten Biotopen nachzuweisen (Kates, 1997).

Die Dietherlipide von Archaea enthalten Isoprenoid-Ketten aus 20 (Phytane) oder 25 Kohlenstoffatomen. Ebenfalls zu finden sind Ketten aus 40 Kohlenstoffatomen (Biphytane). Sie entstehen dadurch, dass zwei gegenüberliegende Geranylgeranyl-Ketten aus je 20 Kohlenstoffatomen miteinander verknüpft werden. Dies führt zur Ausbildung von membrandurchspannenden Tetraetherlipiden. Bei Methanogenen kann die Sättigung der Geranylgeranyl-Ketten unvollständig sein, wodurch Isoprenoid-Ketten mit Hydroxy-Gruppen, Doppelbindungen oder Kombinationen aus pentazyklischen und hexazyklischen Ringen auftreten (Koga et al., 1993).

Bei den Bacteria weisen die Membranen von Thermotogales, Aquificales und einigen Sulfat-reduzierenden Bacteria Besonderheiten auf. Sie enthalten Etherlipide oder gemischte Ester-/Etherlipide, die aber im Gegensatz zu Archaea ausschließlich unverzweigte Kohlenwasserstoffketten (Aquificales und Sulfat-reduzierende Bacteria) (Huber et al., 1992; Rütters et al., 2001) oder 15,16-Dimethyl-30-Glyceryl-Oxytriacontansäure (Thermotogales) (DeRosa et al., 1988; Jahnke et al., 2001) aufweisen.

### **Histone von *N. equitans***

Im Genom von *N. equitans* wurden zwei Gene (Neq288 und Neq348) gefunden, die vermutlich für Histone kodieren (Waters et al., 2003). Eines dieser Gene wies zwei Lysin-Reste in Loop 1 auf, was bisher noch bei keinem archaeellen Histon gefunden wurde, für eukaryotische Histone jedoch üblich ist (Soares et al., 2003). Daher wurden die Histone von *N. equitans* auf Oligomerisierungseigenschaften, DNA-Bindung und Kompaktierung hin untersucht.

Archaea haben keinen Zellkern und ihre Gene sind wie bei den Bacteria häufig in polycistronischen Operons angeordnet (Achenbach-Richter et al., 1988). Jedoch besitzen sie eine den Eukaryota ähnliche Maschinerie zur Prozessierung genetischer Informationen (DNA-Replikation, Transkription und Translation) (Gaasterland und Ragan, 1998; Makarova und Koonin, 2003). Des Weiteren weisen Archaea wie Eukaryota Histonproteine (Sandman und Reeve, 2000) und Introns in tRNA-Genen (Kaine et al., 1983) auf. Lange Zeit wurden Histone innerhalb der Archaea nur bei den Euryarchaeota gefunden (White und Bell, 2002). Dies führte zu Spekulationen über eine späte Entwicklung der Histone, nach der Trennung von Euryarchaeota und Crenarchaeota, und über einen euryarchaeellen Ursprung des eukaryotischen Kerns (Sandman und Reeve, 1998; Slesarev et al., 1998). Vor kurzem wurden jedoch funktionelle Histone in Genomen von unkultivierten Crenarchaeota aus der Sargasso-See nachgewiesen (Čubonová et al., 2005). Dies lässt vermuten, dass sich Histone vor der Aufspaltung der Archaea in die einzelnen Reiche entwickelt haben und in modernen hyperthermophilen Crenarchaeota nachträglich verloren gingen. Die Sekundärstrukturen der Histone von Eukaryota und Archaea sind trotz des großen phylogenetischen Abstands fast identisch (Arents und Moudrianakis, 1995): eine zentrale  $\alpha$ -Helix wird zu beiden Seiten von zwei kürzeren  $\alpha$ -Helices flankiert, die von der zentralen Helix durch  $\beta$ -Strand-Loops getrennt sind. Jedoch weisen eukaryotische Histone im Gegensatz zu archaeellen Histonen charakteristische N- und C-terminale Verlängerungen und Lysin-Reste in Loop 1 (Starich et al., 1996; Soares et al., 2003) auf. Künstlich in archaeelle Histone eingefügt, führen diese Lysin-Reste zu einer verstärkten DNA-Affinität und -Kompaktierung (Soares et al., 2003). Des Weiteren können eukaryotische Histone nur Heterodimere mit spezifischen Partnern bilden (Luger und Richmond, 1998), wohingegen archaeelle Histone sowohl Homo-, als auch Heterodimere ausbilden können (Sandman and Reeve, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene zentrale Aspekte des Organismensystems aus *I. hospitalis* und *N. equitans* untersucht.

Bei *I. hospitalis* lagen die Schwerpunkte in der Aufklärung des CO<sub>2</sub>-Fixierungswegs sowie der Biosynthese von Zuckern und Aminosäuren. Die Untersuchungen wurden durch eine Kombination aus enzymatischen Analysen, Genomanalysen und <sup>13</sup>C-Markierungen an Aminosäuren wachsender Zellen durchgeführt. Vergleichende Analysen der Membranlipide von *I. hospitalis* und *N. equitans* mittels an Gas- bzw. Flüssigchromatographie gekoppelter Massenspektrometrie (GC-MS und LC-MS) sollten die Herkunft der Membranlipide von *N. equitans* klären. Zusätzlich sollte nach spezifischen Lipid-Biomarkern für die Organismen gesucht und die Temperaturabhängigkeit der Membranzusammensetzung überprüft werden. Schließlich sollten die im Genom von *N. equitans* kodierten Histone in *E. coli* exprimiert und in *in vitro* Ansätzen auf ihre Funktionalität (Oligomerisierung und DNA-Kompaktierung) bzw. auf für *N. equitans* spezifische Merkmale hin getestet werden.

## II. Material und Methoden

### 1. Bezugsquellen von Substanzen

#### 1.1. Chemikalien und Lösungsmittel

Acrylamid-Bis-Fertiglösung (37,5 : 1)	Roth, Karlsruhe
Agar bacteriological (Agar No. 1)	Oxoid, Basingstoke, England
Agarose NEEO	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ammoniumformiat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ampicillin, Na-Salz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
AquaPhenol™	Appligene-Oncor, Illkirch, Frankreich
ATP (Adenosin-Triphosphat), Dinatrium-Salz	Roche, Mannheim
BBr <sub>3</sub> , 1,0 M in Methylenchlorid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat)	Roche, Mannheim
Bromphenolblau	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
BSTFA (N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoracetamid)	Pierce, Rockford, USA
CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)	Serva, Heidelberg
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Coomassie Blue R bzw. G	Serva, Heidelberg
dNTPs (Desoxynukleotid-Triphosphate)	Fermentas, Burlington, Canada
Dowex 50® WX8	Serva, Heidelberg
Dowex® 1X8	Serva, Heidelberg
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure), Dinatrium-Salz (Titriplex III)	Serva, Heidelberg
Ethanol, p.A.	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
EtBr (Ethidiumbromid)	Serva, Heidelberg
Glutaraldehydlösung, 25%	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, USA
IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Isopropanol, p.A.	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
KCr(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
NBT (Nitroblue-Tetrazoliumchlorid)	Roche, Mannheim
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Roche, Mannheim
Resazurin	Serva, Heidelberg
Superhydride (Lithium-Triethylborhydrid)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Roth, Karlsruhe
TMCS (Trimethylchlorsilan)	Pierce, Rockford, USA
Tris (Tris-(hydroxymethyl)aminomethan)	USB, Cleveland, USA
Trypton	Difco Laboratories, Detroit, USA
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Roche, Mannheim

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel wurden von der Firma vwr, Darmstadt, bezogen.

### 1.2. PCR-Primer

Folgende Oligonukleotide wurden als Primer verwendet:

Primer:	Sequenz (5' → 3'):
T7 Prom	TAA TAC GAC TCA CTA TA
T7 Term	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G
Neq288F	ATT TCA TAT GAT GCC AGC AAA AAG AGA CAG
Neq288R	AAA CTC GAG GAA AAA AGC TAA TAA AGA T
Neq348F	AAA TAT CAT ATG GCG AAA AGA AAA
Neq348R	AAA CTC GAG AGC TGC GAA TCC CAT TAA

Die Primer wurden von der Firma Metabion bezogen

### 1.3. Enzyme, Plasmide und Reaktionskits

Triosephosphatisomerase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Proteinase K	Roche, Mannheim
AmpliTaQ DNA Polymerase	Fermentas, Burlington, Canada
NdeI, XhoI, EcoRI	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Ipswich, England
pET Expression System 16b bzw. 25b	Novagen, Madison, USA
BugBuster™ protein extraction reagent	Novagen, Madison, USA
Benzoase Nuclease	Novagen, Madison, USA
Ni <sup>2+</sup> -NTA Resin	Novagen, Madison, USA
Factor Xa Cleavage Capture Kit	Novagen, Madison, USA
QIAquick PCR Purification Kit	QIAgen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAgen, Hilden



## 1.4. Antikörper

Mouse-anti-his-tag monoclonal antibody	Novagen, Madison, USA
Anti-mouse-IgG alkaline phosphatase antibody	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Avidin from egg white	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Mouse-anti-Avidin monoclonal antibody	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

## 1.5. Isotopenmarkierte Substrate

[ <sup>14</sup> C]Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, USA
[1- <sup>14</sup> C]Acetat, Na-Salz	Amersham Biosciences, Freiburg
[3- <sup>14</sup> C]Pyruvat, Na-Salz	American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, USA
[1,4- <sup>14</sup> C]Succinat	American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, USA
[U- <sup>14</sup> C]Glucose	American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, USA
[1- <sup>13</sup> C]Acetat, Na-Salz	Euriso-Top, Gif sur Yvette Cedex, France

## 2. Medien

### 2.1. ½ SME-Medium (Stetter et al., 1983, modifiziert durch Huber et al., 2002)

#### 2.1.1. Zusammensetzung

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,16 g
synthetisches Meerwasser	500 ml
Resazurin (0,2 %)	0,5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml
S <sup>0</sup>	10 g
Na <sub>2</sub> S	0,5 g

#### synthetisches Meerwasser:

NaCl	27,70 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	7,00 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	5,50 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,75 g
KCl	0,65 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,03 g
NaBr	0,10 g
SrCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	15 mg
KJ-Lösung (1 mg ml <sup>-1</sup> )	50 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml

### 2.1.2. Herstellung und Sterilisation

Die frisch hergestellten Medien wurden in eine 1 l Duranglasflasche (Schott, Mainz) abgefüllt. Schwefel wurde mit Hilfe eines Ultra-Turrax (TP1842, Janke und Kunkel, Staufen) homogenisiert. Die Duranglasflaschen wurden mit einem Gummistopfen und einer durchbohrten Schraubkappe verschlossen. Um den Sauerstoff aus dem Medium zu entfernen, wurde das Medium 30 min unter Druckausgleich mit N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20, v/v) durchgast. Der im Medium verbliebene Sauerstoff wurde entfernt, indem das Medium mit der angegebenen Menge Na<sub>2</sub>S bis zur Entfärbung des Redoxindikators Resazurin reduziert wurde. Anschließend wurde der pH-Wert von pH 5,5–6,0 durch das Zuspritzen von halbkonzentrierter H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eingestellt.

Die Medien wurden in der Anaerobenkammer (Coy Laboratory Products Inc. USA, Arbor, Michigan, USA) abgefüllt. Dabei wurden je 20 ml des Mediums in 120 ml Serumflaschen (Natronkalksilikatglas, Pharmapach Stute, Rheinbreitenbach), bzw. 250 ml in 1 l Druckflaschen (Borsilikat, Müller und Krempel AG, Büllach, Schweiz) überführt. Die Serumflaschen wurden mit Gummistopfen (Deutsch und Neumann, Berlin) verschlossen und mit Alu-Bördelkappen (WICOM, Heppenheim) gesichert. Die 1 l Druckflaschen wurden ebenfalls mit Gummistopfen verschlossen und mit metallenen Schraubkappen gesichert.

Abschließend wurden die Serumflaschen bzw. Druckflaschen an der Gasstation je dreimal evakuiert und H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20, v/v) mit 200 kPa (Serumflaschen) bzw. 160 kPa (1 l Druckflaschen) Druck aufgepresst. Die Medien wurden für 60 min bei 110 °C im Autoklaven (STM 201, Wolf, Geislingen) sterilisiert.

### 2.1.3. Herstellung und Sterilisation für Großanzuchten im Fermenter

Die Salze des ½ SME-Mediums wurden eingewogen, im Fermenter (HTE, Bioengineering, Wald, Schweiz) in der entsprechenden Menge H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst. Nach Durchgasung mit N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20, v/v) wurde das Medium im Fermenter für 40 min bei 121 °C und 200 kPa Druck sterilisiert. Schwefel wurde separat eingewogen, mit dem Ultra-Turrax (TP1842, Janke und Kunkel, Staufen) in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> homogenisiert und für 60 min bei 110 °C im Autoklaven (STM 201, Wolf, Geislingen) sterilisiert. Na<sub>2</sub>S wurde ebenfalls separat eingewogen, in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst, und im Autoklaven für 20 min bei 121 °C und 200 kPa Druck autoklaviert. *I. hospitalis* und die Cokultur aus *I. hospitalis* und *N. equitans* können im Fermenter aus unbekannten Gründen nur in Gegenwart von 0,1 % Hefeextrakt oder veraschtem Hefeextrakt kultiviert werden. Deswegen wurde standardmäßig 0,1 % Hefeextrakt zugegeben, der separat eingewogen und für 20 min bei 121 °C und 200 kPa Druck autoklaviert wurde. Vor dem Animpfen wurden Schwefel, Na<sub>2</sub>S und Hefeextrakt in den Fermenter überführt und der pH-Wert des Mediums mit steriler H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 5,5–6,0 eingestellt.

## 2.2. LB-Medium (Miller, 1972)

### 2.2.1. Bestandteile

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml
Agar (nur bei Gussplatten)	15 g

### 2.2.2. Herstellung und Sterilisation

Je nach Bedarf wurden je 10 ml LB-Medium in Reagenzröhrchen abgefüllt und mit Aluminiumdeckeln verschlossen, bzw. je 500 ml Medium in 1 l Erlenmeyerkolben abgefüllt und mit Alufolie verschlossen. Die Medien wurden für 20 min bei 121 °C und 200 kPa autoklaviert (STM 201, Wolf, Geislingen). Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Dunkeln. Für die Gussplatten wurden nach dem Autoklavieren je 15 ml der flüssigen LB-Agar-Lösung in Plastikpetrischalen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) gefüllt und bis zum Erstarren abgekühlt. Je nach Bedarf wurden den Medien nachträglich sterilfiltrierte Antibiotika-Lösungen zugegeben.

## 3. Verwendete Organismen und Kultivierungsbedingungen

### 3.1. *I. hospitalis* bzw. Cokultur Kin4/M aus *I. hospitalis* und *N. equitans*

#### 3.1.1. Verwendete Stämme und Kultivierungsbedingungen

Organismus	Stamm	Herkunft
<i>Ignicoccus hospitalis</i>	Kin4/I	BBR 17/12/4
<i>Nanoarchaeum equitans</i> in Cokultur mit <i>I. hospitalis</i>	Kin4/M	BBR 17/10/4

Die Organismen wurden aus der Bakterienbank Regensburg (BBR) bezogen. Sie wurden in ½ SME-Medium inkl. 0,1 % S<sup>0</sup>, pH 5,5–6,0, Gasphase H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20, v/v) bei 90 °C kultiviert.

#### 3.1.2. Erstellung von Wachstumskurven

Alle 60–90 min wurden Proben genommen, und die Zellkonzentration mittels einer Thoma-Zählkammer (Tiefe 0,02 mm) unter 400-facher Vergrößerung im Phasenkontrastmikroskop bestimmt. Aufgrund des definierten Volumens eines Kleinstquadrates der Zählkammer (0,02 mm x 0,05 mm x 0,05 mm) kann die Zellkonzentration mit folgender Formel ermittelt werden:  
 Gesamtzellzahl ml<sup>-1</sup> = Zellzahl pro Kleinstquadrat x 2 x 10<sup>7</sup> ml<sup>-1</sup>

### 3.1.3. Kultivierung in Serumflaschen

Serumflaschen wurden über eine Spritze mit Vorkultur beimpft (Animpfdichte ca.  $10^5$  *I. hospitalis*-Zellen  $\text{ml}^{-1}$ ). Die Inkubation erfolgte unter Schütteln (50 rpm) bei 90 °C im Inkubationsschrank.

### 3.1.4. Kultivierung im Fermenter

Der Fermenter wurde mit einer Animpfdichte von ca.  $10^5$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  beimpft. Anschließend wurde er mit  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (80:20, v/v) mit einem Druck von 300 kPa überschichtet und die Rührung auf 100 rpm eingestellt. Ab einer Zellkonzentration von  $10^6$  *I. hospitalis*-Zellen  $\text{ml}^{-1}$  wurde die Cokultur mit  $\text{N}_2/\text{H}_2/\text{CO}_2$  (65:15:20, v/v/v) mit einer Flussrate von 15  $\text{l min}^{-1}$  (50 l Fermenter), 20  $\text{l min}^{-1}$  (100 l Fermenter) oder 30  $\text{l min}^{-1}$  (300 l Fermenter) bis zum Erreichen der stationären Phase durchgast. Die Reinkultur von *I. hospitalis* wurde mit deutlich geringeren Durchflussraten von 1  $\text{l min}^{-1}$  (50 l Fermenter), 2  $\text{l min}^{-1}$  (100 l Fermenter) oder 5-10  $\text{l min}^{-1}$  (300 l Fermenter) durchgast. Zum Beenden der Kultivierung wurde der Fermenter auf 18 °C abgekühlt.

### 3.1.5. Ernte nach Kultivierung im Fermenter

Die Zellen wurden aus dem Fermenter über eine Durchlaufzentrifuge (Typ Z416, Padberg, Lahr) bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 30  $\text{l h}^{-1}$  geerntet. Die geernteten Zellmassen wurden in dem im Zentrifugenrotor verbleibenden Medienrest suspendiert. Darauf wurden sie in der Sorvall-Zentrifuge abzentrifugiert (Sorvall Superspeed RC2-B, GSA-Rotor, 9000 rpm, 30 min, 4 °C). Die Zellen wurden über flüssigem Stickstoff bei -140 °C aufbewahrt.

### 3.1.6. Gewinnung einer stark aufkonzentrierten *N. equitans*-Fraktion durch differentielle Zentrifugation

Die im Fermenter als Cokultur gezüchteten *I. hospitalis* und *N. equitans*-Zellen wurden nach der Ernte über die Durchlaufzentrifuge in dem verbleibenden Medienrest resuspendiert. Die Suspension wurde auf 2 C60-Rotorenbecher der Jouan-Zentrifuge (Jouan KR 4.22, C60-Rotor) verteilt, und die Becher mit schwefelfreiem  $\frac{1}{2}$  SME-Medium aufgefüllt. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 4300 rpm und 4 °C befanden sich freie *N. equitans*-Zellen im Überstand, während *I. hospitalis* und anheftende, aber auch ein Teil der freien *N. equitans*-Zellen pelletiert waren. Der Überstand wurde in 6 GSA-Rotorenbecher überführt, und die *N. equitans*-Zellen 1 h bei 13000 Upm und 4 °C (GSA-Rotor, Sorvall Superspeed RC2-B) abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 10 ml schwefelfreiem  $\frac{1}{2}$  SME-Medium vereinigt und erneut abzentrifugiert (SS34-Rotor, Sorvall Superspeed RC2-B, 30 min, 18000 rpm, 4 °C). Die Aufbewahrung erfolgte über flüssigem Stickstoff bei -140 °C.

### 3.2. *E. coli*

#### 3.2.1. Verwendete Stämme und Kultivierungsbedingungen

Organismus	Stamm	Herkunft
<i>Escherichia coli</i>	DH5α	Life Technologies, Gaithersburg, USA
	Rosetta™	Novagen, Madison, USA
	Rosetta-gami™	
	BL21 (DE3)pACYC-RIL	Avidis, Saint Beaulieu, France
	C43 (DE3) Walker	

Die Zellen wurden bei 37 °C in LB-Medium unter Schütteln (Flüssigmedien) oder in einer auf den Deckel gestellten Petrischale (Gussmedien) inkubiert. Dem LB-Medium wurde nach Bedarf das für den jeweiligen Stamm erforderliche Antibiotikum zugefügt:

Rosetta-gami™: Kanamycin, 50 µg ml<sup>-1</sup>

Rosetta™, BL21 (DE3)pACYC-RIL und C43 (DE3) Walker: Chloramphenicol, 34 µg ml<sup>-1</sup>

Die Langzeitaufbewahrung erfolgte in 60 % Glycerin, bei -80°C.

#### 3.2.2. Erstellung von Wachstumskurven

Zur Erstellung von Wachstumskurven von *E. coli* wurde alle 60–90 min die optische Dichte des Mediums bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt (Photometer DU-640, Beckmann, München).

## 4. Analyse von Proteinfractionen

### 4.1. Molekularmassenbestimmung von Proteinen

Die Molekularmassenbestimmung von Proteinen erfolgte über die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli (Lämmli, 1970) mit anschließender Coomassie-Blue-R-Färbung des Gels.

### 4.2. Western-Blot

Die Detektion HisTag-markierter oder biotinylierter Proteine erfolgte über Western-Blot mit anschließender Detektion über spezifische Antikörper. Die Proteine wurden nach der Auftrennung über ein SDS-Polyacrylamidgel (4.3.) auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore, Bedford, USA) geblottet. Dies erfolgte in der Trans Blot SD Semi Dry Transfer Cell, Biorad, München, für 35 min bei 24 Volt. Die Membran wurde nach erfolgtem Blot mind. 1 h in 15 ml Blocking Solution geschwenkt.

<u>Transferpuffer:</u>	Tris/HCl, pH 8,3	25 mM
	Glycin	192 mM
<u>Blocking Solution:</u>	Tris	50 mM
	NaCl	150 mM
	BSA	3 % (w/v)
<u>TBS-Puffer:</u>	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
<u>TBSTT-Puffer:</u>	Tris/HCl, pH 8,0	20 mM
	NaCl	150 mM
	Tween 20	0,05 % (v/v)
	Triton X	0,5 % (v/v)
<u>AP-Puffer:</u>	Tris/HCl, pH 9,5	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM

Für die Detektion HisTag-markierter Proteine wurde die Membran für 1 h in 10 ml Blocking Solution inkl. 10 µl Mouse-anti-his-tag monoclonal antibody inkubiert. Anschließend wurde 2x für 10 min mit 20 ml TBSTT und 1x für 10 min mit 15 ml TBS gewaschen. Darauf wurde sie für 1 h in 10 ml Blocking Solution inkl. 1,5 µl Anti-mouse-IgG alkaline phosphatase antibody inkubiert. Nach 3-maligem Waschen in 20 ml TBSTT für je 15 min wurde die Membran in 15 ml AP-Lösung inkl. 150 µl NBT- und 75 µl BCIP-Lösung (je 5 %, w/v, in Dimethylformamid) im Dunkeln entwickelt. HisTag-gekoppelte Proteine zeigten eine violette Bandenfärbung.

Die Detektion biotinylierter Proteine erfolgte nach Gallagher et al., 1997, und Ménendez et al., 1999. Die Membran wurde nach der Inkubation in der Blocking Solution für 1 h in 10 ml Blocking Solution inkl. 5 µl Avidin geschwenkt. Nach Waschen (2x 10 min in 10 ml TBSTT, 1x 10 min in 15 ml TBS) wurde die Membran für 1 h in 10 ml Blocking Solution inkl. 10 µl Mouse-anti-Avidin monoclonal antibody inkubiert. Nach diesem Schritt wurde nochmals gewaschen (2x 10 min in 10 ml TBSTT, 1x 10 min in 15ml TBS), und der Blot in 10 ml Blocking Solution inkl. 1,5 µl Anti-mouse-IgG alkaline phosphatase antibody inkubiert. Die Detektion erfolgte über NBT und BCIP, wie oben beschrieben.

### 4.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinfractionen

Die Proteinbestimmung erfolgte über die Methode nach Bradford (Bradford, 1976).

## **5. Untersuchung des Kohlenstoffmetabolismus in *I. hospitalis***

### **5.1. Kultivierung von *I. hospitalis* für analytische Untersuchungen**

#### **5.1.1. Produktion von Zellmassen von *I. hospitalis* für enzymatische Analysen**

Die Enzymtests für die Untersuchung biosynthetischer Prozesse sollten mit autotroph kultivierten *I. hospitalis*-Zellen durchgeführt werden, jedoch kann *I. hospitalis* seit Längerem aus bisher unbekannten Gründen im Fermenter nur mit Zufuhr von Hefeextrakt kultiviert werden. Dieser kann durch veraschten Hefeextrakt ersetzt werden (Paper, 2005). Durch die Veraschung des Hefeextrakts werden alle organischen Verbindungen hydrolysiert. Dazu wurden 0,05 % Hefeextrakt (w/v) eingewogen, und in der dreifachen Menge (v/w) konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  über Nacht gerührt. Diese Lösung wurde durch konzentrierte NaOH neutralisiert, 40 min bei 121 °C und 200 kPa autoklaviert, und dem Fermenter vor dem Animpfen zugegeben.

Des Weiteren sollten für die Enzymtests Zellen verwendet werden, die in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet wurden. Dazu wurden während der Fermentationen Wachstumskurven angefertigt (3.1.2). In der späten exponentiellen Phase, bei einer Zellzahl von ca.  $5 \times 10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ , wurden die Zellen geerntet.

Abgesehen von diesen Modifikationen erfolgte die Aufzucht wie unter 3.1.4 beschrieben.

#### **5.1.2. Test zur Inkorporation organischer Substrate durch *I. hospitalis***

Die Aufnahme organischer Substrate in *I. hospitalis*-Zellen wurde getestet, indem man die Zellen in 250 ml  $\frac{1}{2}$  SME-Medien (Gasphase  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ , 80:20 (v/v), 200 kPa) kultivierte, denen eine Mischung aus  $^{14}\text{C}$ -markierten und unmarkierten Acetat, Pyruvat, Succinat bzw. Glucose (630 ,140, 140 bzw. 165 kBq, je 0,5 mM) zugegeben wurde. In Abständen von 100–120 min wurden 50 ml fassende Proben entnommen. Von diesen wurde die Zellzahl bestimmt (3.1.2). Darauf wurden davon 2x 100  $\mu\text{l}$  und 2x 200  $\mu\text{l}$  entnommen. Anschließend wurden die Proben 30 min bei 18000 rpm zentrifugiert (SS34-Rotor, Sorvall Superspeed RC2-B). Vom zellfreien Überstand wurden 2x 100  $\mu\text{l}$  und 2x 200  $\mu\text{l}$  entnommen. Das Pellet wurde in 15 ml schwefelfreiem  $\frac{1}{2}$  SME-Medium gewaschen, wodurch restliche gelöste, radioaktiv markierte Substanzen vom Zellpellet entfernt wurden. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (18000 rpm, 30 min) wurde das Pellet in 100  $\mu\text{l}$  schwefelfreiem  $\frac{1}{2}$  SME-Medium gelöst. Alle Proben wurden mit schwefelfreiem  $\frac{1}{2}$  SME-Medium auf 200  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und mit 3 ml Szintillationscocktail (Rotiscint eco plus, Roth, Karlsruhe) versetzt. Anschließend wurde die Radioaktivität in einem Szintillationszähler (Tri Carb 2100TR, Packard, Meriden, USA) gemessen. Die Zählausbeute wurde über das Kanalverhältnis bestimmt und lag bei 75-90 %. Die gemessenen Werte wurden entsprechend korrigiert.

### 5.1.3. Produktion $^{13}\text{C}$ -markierter Zellmassen von *I. hospitalis*

Die Produktion  $^{13}\text{C}$ -markierter Zellmassen erfolgte unter den in 5.1.1. aufgeführten Bedingungen: die Zellen wurden autotroph im Fermenter kultiviert und in der exponentiellen Phase geerntet. Zur  $^{13}\text{C}$ -Markierung der Zellen wurde dem Medium jedoch zusätzlich 0,5 mM  $[1-^{13}\text{C}]\text{Acetat}$  zugeführt. Aufgrund der erhöhten Flüchtigkeit von Acetat durch die hohe Kultivierungstemperatur (90 °C) und den leicht erniedrigten pH-Wert (pH 5,5-6,0) wurde bei dieser Kultivierung auf eine Durchgasung mit  $\text{N}_2/\text{H}_2/\text{CO}_2$  (65:15:20, v/v/v) verzichtet.

## 5.2. Isolierung und Hydrolyse der Proteinfraction aus den $^{13}\text{C}$ -markierten Zellmassen

Nach der Ernte der  $^{13}\text{C}$ -markierten Zellmassen wurden 3 g Zellen (Nassgewicht) in 3 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  resuspendiert. Die Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen (Sonifier 250, Branson, Danbury, USA). Nach dem Zellaufschluss wurden 3 ml 70 % (v/v)  $\text{HClO}_4$  zugegeben, um die Proteine zu fällen. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis folgte ein Zentrifugationsschritt (60 min, 12000 g, 4 °C) im SS34-Rotor der Sorvall-Zentrifuge (Sorvall Superspeed RC2-B). Um niedermolekulare Substanzen zu entfernen, wurde das resultierende Pellet 3x mit 10 ml 0,5 M  $\text{HClO}_4$  gewaschen und jeweils für 30 min bei 12000 g abzentrifugiert. Um die Nukleinsäuren zu extrahieren, wurde das Pellet in 10 ml 0,5 M  $\text{HClO}_4$  resuspendiert und für 20 min bei 70 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (45 min, 12000 g, 4 °C) blieben die Nukleinsäuren im Überstand und die Proteine im Pellet. Um die Lipide zu extrahieren, wurde das Pellet in einer Mischung aus Ethanol und Diethylether (3:1, v/v) resuspendiert und für 1 h bei 40 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (45 min, 12000 g, 4 °C) blieben die Lipide im Überstand und die Proteine im Pellet. Nachdem das Pellet in 10 ml Diethylether gewaschen und erneut abzentrifugiert wurde (45 min, 12000 g, 4 °C), wurde es durch Lyophilisation über Nacht getrocknet (Revco, Pabisch GmbH & Co, KG, München).

Zur Hydrolyse der Proteine in die einzelnen Aminosäuren wurden dem Pellet 3 ml 6 M  $\text{HCl}$  zugegeben. Die Suspension wurde in Borsilikatglas-Ampullen (Körper 15x65 mm, mit Gasrohr, Zitt Thoma GmbH, Freiburg) überführt, die evakuiert und daraufhin zugeschmolzen wurden. Die Suspension wurde in den Ampullen für 12 h bei 121 °C im Autoklaven inkubiert.



### 5.3. Auftrennung der Aminosäuren

Die Aminosäuren wurden nach Eisenreich et al., 1991, durch hintereinander geschaltete Ionenaustauschchromatographien aufgetrennt. Die Chromatographiesäulen (Volumen: 125 ml, Durchmesser: 20 mm, Roth, Karlsruhe) wurden dazu mit spezifischen Säulenmaterialien (Dowex 50<sup>®</sup> WX8 bzw. Dowex<sup>®</sup> 1X8) beladen. Die Flussrate betrug 100 ml h<sup>-1</sup>, die Fraktionsgröße 15 ml. Die erhaltenen Fraktionen wurden per Dünnschichtchromatographie analysiert. Je 1 µl der Fraktionen wurde auf cellulosebeschichtete Plastikfolien (20x20 cm, Cellulose F, vwr, Darmstadt) aufgetragen. Als Laufmittel wurde n-Butanol/Eisessig/H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (50:20:30, v/v/v) verwendet. Wenn die Laufmittelfront bis ca. 1 cm unter der oberen Plattenkante weit gelaufen war, wurde die Platte trocken geföhnt und mit dem Färbereagens (0,15 g Ninhydrin in 50 ml n-Butanol) eingesprüht. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 90 °C wurden Aminosäuren durch Ninhydrin lila gefärbt. Die Fraktionen, die die einzelnen Aminosäuren enthielten, wurden vereinigt und im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Zur Entsalzung wurden sie darauf je 3x in 20 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und durch Lyophilisation getrocknet (Revco, Pabisch GmbH & Co, KG, München).

#### 5.3.1. Abtrennung der positiv geladenen Aminosäuren

60 g Dowex 50<sup>®</sup> WX8 wurden über Nacht in 500 ml 2 M Ammoniumformiat inkubiert. Anschließend wurde das Dowex mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen, bis der pH-Wert der Suspension neutral war. Mit dem so vorbereiteten Dowex 50<sup>®</sup> WX8 wurde die Säule beladen. Das Aminosäuregemisch wurde nach der sauren Hydrolyse in 20 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und auf die Säule aufgetragen. Zunächst wurde mit 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> eluiert. Darauf wurde mit 1 l 0,2 M Ammoniumformiat (pH 4,5, mit Ameisensäure eingestellt), anschließend mit 1 l 0,2 M Ammoniumformiat (pH 6,5) und schließlich mit 1 l 0,5 M Ammoniumformiat (pH 6,5) eluiert. Die verschiedenen Aminosäuren befanden sich in folgenden Fraktionen: 14–18, neutrale und saure Aminosäuren; 19–23, Phenylalanin und Tyrosin; 31–38, Lysin; 41–44, Histidin; 81–89, Arginin.

#### 5.3.2. Abtrennung der sauren Aminosäuren

60 g Dowex<sup>®</sup> 1X8 wurden über Nacht in 500 ml 2 M Ammoniumformiat inkubiert. Anschließend wurde das Dowex mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen, bis der pH-Wert der Suspension neutral war, und die Säule beladen. Die im Rotationsverdampfer vereinigten, sauren und neutralen Aminosäuren wurden in 20 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und auf die Säule aufgetragen. Die Aminosäuren wurde zunächst mit 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>, anschließend mit 1 l 10 mM Ameisensäure eluiert. Die verschiedenen Aminosäuren befanden sich in folgenden Fraktionen: 3–8, neutrale Aminosäuren; 25–27, Glutamat und Aspartat.

### 5.3.3. Auftrennung der neutralen Aminosäuren

60 g Dowex 50<sup>®</sup> WX8 wurden über Nacht in 500 ml 3 M HCl inkubiert. Anschließend wurde das Dowex mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen, bis der pH-Wert der Suspension neutral war, und die Säule beladen. Die im Rotationsverdampfer vereinigten, neutralen Aminosäuren wurden in 20 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und auf die Säule aufgetragen. Zunächst wurde mit 200 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>, anschließend mit einem Gradienten von 0-3 M HCl (Gesamtvolumen 1 l) eluiert. Die verschiedenen Aminosäuren befanden sich in folgenden Fraktionen: 21-30, neutrale Aminosäuren, Serin und Threonin; 41-53, Glycin und Alanin; 54-60: Valin und Prolin; 64-77, Isoleucin und Leucin.

### 5.3.4. Auftrennung von Phenylalanin und Tyrosin

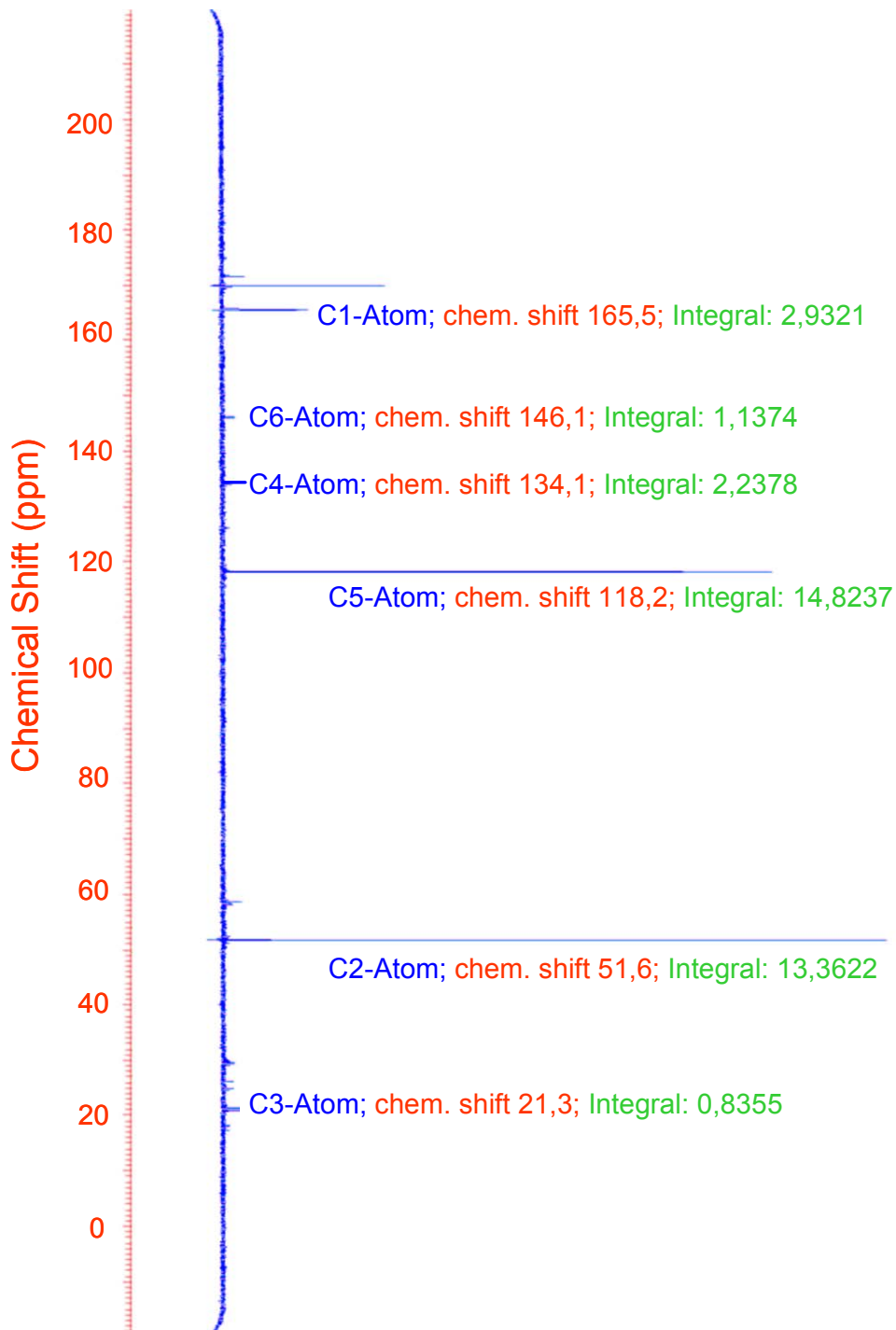
Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin wurden durch präparative HPLC an der reversen Phase Lichrosorb RP<sub>18</sub> (16x20 mm, vwr, Darmstadt) getrennt. Die Detektion erfolgte im Durchflussphotometer bei 280 nm. Die Säule wurde vor der Auftragung der Aminosäuren für ca. 30 min mit Methanol, darauf für 1 h mit entgastem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (je 10 ml min<sup>-1</sup>) gewaschen. Die im Rotationsverdampfer vereinigten, aromatischen Aminosäuren wurden in 5 ml entgastem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> inkl. 4 Tropfen DCI gelöst und über ein Probenventil zugespritzt. Die Elution erfolgte mit entgastem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (40 ml min<sup>-1</sup>). Die aromatischen Aminosäuren eluierten mit folgenden Retentionszeiten: 18-23 min, Tyrosin; 38-42 min, Phenylalanin.

## 5.4. NMR-Analyse der Aminosäuren

Zur NMR-Analyse wurden Glutamat und Aspartat in 1 ml 0,1 M NaOD (pH 13) in D<sub>2</sub>O gelöst. Die anderen Aminosäuren wurden in je 1 ml 0,1 M DCI (pH 1) in D<sub>2</sub>O gelöst. Die NMR-Analysen wurden von Dr. Wolfgang Eisenreich, Arbeitsgruppe Prof. Adelbert Bacher, am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München durchgeführt. <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren wurden mit einem DRX500-Spektrometer (Bruker Biospin, Rheinstetten) bei 500,13 bzw. 125,76 MHz aufgenommen. Die <sup>13</sup>C-Anreicherungen in den einzelnen Kohlenstoffpositionen der markierten Aminosäuren wurden ermittelt, indem die Signalintegrale der einzelnen C-Atome mit den entsprechenden Signalintegralen aus Proben natürlicher <sup>13</sup>C-Anreicherung verglichen wurden (Eisenreich und Bacher, 2000). Die einzelnen C-Atome der Aminosäuren weisen charakteristische "chemical shifts" auf. Dieser "chemical shift" ist die Differenz der Resonanzfrequenz des Atomkerns zu der Resonanzfrequenz des Standards (3-Trimethylsilyl-1-Propansulfonat). Er wird in „ppm“ angegeben. Die relativen Werte für die <sup>13</sup>C-Anreicherung wurden normiert, indem dem Kohlenstoffatom mit der niedrigsten <sup>13</sup>C-Anreicherung ein <sup>13</sup>C-Prozentsatz von 1,1 %

(entspricht der natürlichen Anreicherung von  $^{13}\text{C}$ ) zugeteilt wurde. Zur Verifizierung wurden für Aminosäuren zusätzlich  $^{13}\text{C}$ -gekoppelte Satelliten in  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren bestimmt.

Abb. 1 zeigt beispielhaft das erhaltene  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Histidin. Deutlich zu erkennen ist eine starke  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den Kohlenstoffpositionen C2 und C5 des Histidins.



**Abb. 1:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum der Aminosäure Histidin aus *I. hospitalis* nach dessen Kultivierung in Gegenwart von  $[1-^{13}\text{C}]\text{Acetat}$ . Für die Normierung wurde hier dem C3-Atom der Wert von 1,1 % natürlicher  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung zugeteilt.

## 5.5. Enzymtests

### 5.5.1. Zellaufschluss in der Zelmühle

0,1 g Zellen wurden in der Anaerobenkammer in Durham-Röhrchen (Paul Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen) mit 0,5 ml anoxischem Aufschlusspuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,8, 3 mM DTE, 0,1 mg DNase I ml<sup>-1</sup>) versetzt. Für Analysen von Enzymen der Gluconeogenese enthielt der Puffer zusätzlich 20 mM MgCl<sub>2</sub>. Darauf wurden 0,5 g Glasperlen zugegeben (Durchmesser 0,1–0,25 mm, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen). Nachdem das Durham-Röhrchen gasdicht mit einem Gummistopfen verschlossen wurde, wurde es aus der Anaerobenkammer ausgefahren und in der Zelmühle (MM 200, Retsch, Haan) für 6 min bei 100 % Intensität (30 Hz) geschüttelt. Es folgten 10 min Zentrifugation bei 20000 g (Centrifuge 5420, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde mit einer Spritze entnommen und als Zellextrakt verwendet.

### 5.5.2. Enzymtests gekoppelt an die Reduktion/Oxidation von NAD(P)<sup>+</sup>/NAD(P)H

Enzymreaktionen, die an die Reduktion/Oxidation von Pyridin-Nukleotiden gekoppelt waren, wurden bei 75 °C getestet und photometrisch bei 365 nm ( $\epsilon_{365}(\text{NAD(P)H}) = 3,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) verfolgt. Bis auf die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase verliefen die Tests nach Hügler et al., 2003.

ATP:Citrat-Lyase: Die Aktivität der ATP:Citrat-Lyase wurde bestimmt, indem die Reaktion an die Aktivität der endogenen Malat-Dehydrogenase gekoppelt wurde. Diese oxidiert NADH, indem sie Oxalacetat, das Produkt der ATP:Citrat-Lyase, reduziert. Es wurde die Citrat-, CoA- und MgATP-abhängige Oxidation von NADH verfolgt. Der Ansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 7,8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM ATP, 0,5 mM CoA, 0,4 mM NADH und 3 mM Citrat. Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von Citrat gestartet.

Reduktion von Malonyl-CoA zu 3-Hydroxypropionat: Es wurde die Malonyl-CoA-abhängige Oxidation von NADPH verfolgt. Der Ansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 7,8, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM NADPH und 0,5 mM Malonyl-CoA. Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von Malonyl-CoA gestartet.

Reduktion von 3-Hydroxypropionat zu Propionyl-CoA: Es wurde die 3-Hydroxypropionat-, CoA- und MgATP-abhängige Oxidation von NADPH verfolgt. Der Ansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM ATP, 0,5 mM CoA, 0,4 mM NADPH und 1 mM 3-Hydroxypropionat. Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von 3-Hydroxypropionat gestartet.

2-Oxoglutarat and Pyruvat-Dehydrogenase: Es wurde die 2-Oxoglutarat- oder Pyruvat- und CoA-abhängige Reduktion von NAD<sup>+</sup> oder NADP<sup>+</sup> verfolgt. Der Ansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 7,8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM NAD<sup>+</sup> oder NADP<sup>+</sup>, 0,5 mM CoA und 5 mM 2-Oxoglutarat oder Pyruvat. Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von 2-Oxoglutarat oder Pyruvat gestartet.

Malat-Dehydrogenase: Es wurde die Oxalacetat-abhängige Oxidation von NADPH oder NADH verfolgt. Der Ansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 7,8, 0,3 mM NADH oder NADPH, und 1 mM Oxalacetat. Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von Oxalacetat gestartet.

Isocitrat-Dehydrogenase: Es wurde die Isocitrat-abhängige Reduktion von  $\text{NADP}^+$  verfolgt. Der Ansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 7,8, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{NADP}^+$ , 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und 10 mM D/L-Isocitrat. Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von Isocitrat gestartet.

Aconitase: Die Aktivität der Aconitase wurde bestimmt, indem die Reaktion an die Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase gekoppelt wurde, die  $\text{NADP}^+$  reduziert. Der Ansatz war identisch zu dem des Isocitrat-Dehydrogenase-Tests, jedoch wurden statt 10 mM D/L-Isocitrat 10 mM Citrat zugefügt. Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von Citrat gestartet.

Pyruvat-Kinase: Die  $\text{MgADP}$ -abhängige Transformation von PEP zu Pyruvat wurde gemessen, indem man nach Ablauf der Enzymreaktion über eine exogen zugeführte Laktat-Dehydrogenase die  $\text{NADH}$ -abhängige Transformation von Pyruvat zu Laktat bestimmte. Der Ansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 7,8, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM DTE, 5 mM ADP und 2 mM PEP. Der Ansatz wurde bei 85°C inkubiert, wobei die Zufuhr von PEP die Reaktion startete. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die Reaktion durch Abkühlen auf 4 °C gestoppt. Darauf wurden 0,4 mM  $\text{NADH}$  und 1 Unit ( $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ ) Laktat-Dehydrogenase zugeführt. Die Oxidation von  $\text{NADH}$  wurde spektrophotometrisch bei 37 °C verfolgt.

Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase: Es wurde die Phosphat- und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-abhängige Reduktion von  $\text{NAD(P)}^+$  verfolgt. Der Ansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 7,8, 100 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2 mM  $\text{NAD(P)}^+$  und 3 mM Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von Glycerinaldehyd-3-Phosphat gestartet.

### 5.5.3. Enzymtests gekoppelt an die Reduktion/Oxidation von Methylviologen

Für bestimmte Reaktionen (Bsp. Ferredoxin-abhängige Enzymreaktionen) wurde Methylviologen als alternativer Elektronenakzeptor eingesetzt. Die Reduktion/Oxidation von Methylviologen kann im Anoxischen spektrophotometrisch bei 578 nm ( $\epsilon_{578} \text{ (MV)} = 9,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) verfolgt werden (Dawson et al., 1986). Für die Tests wurde folgender anaerober Puffer in  $\text{N}_2$ -gefluteten Messküvetten verwendet: 100 mM Tris/HCl pH 7,8, 4 mM DTE, 2 mM  $\text{MgCl}_2$  und 4 mM Methylviologen. Dem Puffer wurde über den Gummiverschluss Dithionit aus einer 5 mM Stammlösung zugespritzt, bis eine schwache aber konstant blaue Färbung des Puffers eintrat. Die Tests wurden bei 75 °C durchgeführt.

2-Oxoglutarat und Pyruvat: Akzeptor-Oxidoreduktase. Der Ansatz enthielt Puffer, 1 mM CoA und 3 mM 2-Oxoglutarat oder Pyruvat. Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von 2-Oxoglutarat oder Pyruvat gestartet. Zur Kontrolle wurden die Ansätze unter Zugabe von 0,5 mM Thiamin-Pyrophosphat (dient als Cofaktor für den Transfer von Carboxylgruppen) wiederholt.

CO-Dehydrogenase: Der Tests wurde nach Hügler et al., 2003, durchgeführt. Der Ansatz enthielt Puffer und CO-Gas (200 kPa). Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von Protein gestartet. In Kontrollexperimenten wurde CO durch N<sub>2</sub>-Gas ersetzt.

Formiat-Dehydrogenase: Der Ansatz enthielt Puffer und 3 mM Formiat. Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von Formiat gestartet.

Fumarat-Reduktase: Der Ansatz enthielt Puffer und 1 mM Fumarat. Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von Fumarat gestartet.

### 5.5.4. Weitere photometrische Enzymtests

Diese Tests wurden unter anoxischen Bedingungen bei 75 °C durchgeführt.

L-Malyl-CoA-Lyase: Die Malyl-CoA-abhängige Bildung von Glyoxylat-Phenylhydrazin wurde spektrophotometrisch bei 324 nm ( $\epsilon_{324} = 1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) nach Herter et al., 2001, verfolgt. Der Ansatz enthielt 200 mM Morpholino-Propan-Sulphonsäure (MOPS)/KOH pH 7,7, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 3,5 mM Phenylhydrazoniumchlorid und 0,2 mM L-Malyl-CoA. Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von L-Malyl-CoA gestartet.

Isocitrat-Lyase: Die Isocitrat-abhängige Bildung von Glyoxylat-Phenylhydrazin wurde nach Hügler et al., 2003, spektrophotometrisch bei 324 nm ( $\epsilon_{324} = 1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) verfolgt. Der Ansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 7,8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3,5 mM Phenylhydrazoniumchlorid und 2,5 mM D/L-Isocitrat. Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von Isocitrat gestartet.

Fumarat-Hydratase: Der Abnahme von Fumarat wurde spektrophotometrisch bei 240 nm ( $\epsilon_{240} = 2440 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) nach Bergmeyer, 1970, verfolgt. Der Ansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 7,8 und 0,2 mM Fumarat. Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von Fumarat gestartet.

Citrat-Synthase: Die Acetyl-CoA- und Oxalacetat-abhängige Freisetzung von CoA wurde spektrophotometrisch mit 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoe-Säure) (DTNB) als CoA-bindender Zusatz bei 412 nm ( $\epsilon_{412} = 1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) verfolgt (Dawson et al., 1986). Der Ansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 7,8, 0,25 mM DTNB, 0,2 mM Acetyl-CoA und 2 mM Oxalacetat. Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von Acetyl-CoA oder Oxalacetat gestartet.

### 5.5.5. Enzymtests mit anschließender Phosphatbestimmung

Bestimmte Reaktionen bewirkten eine Substrat-abhängige Freisetzung von anorganischem Phosphat aus phosphorylierten Substraten. Diese wurden verfolgt, indem die Substrat- und Zellextrakt-abhängige Zunahme von anorganischem Phosphat im Ansatz (Gesamtvolumen 250 µl) bestimmt wurde. Der Puffer enthielt 100 mM Tris/HCl pH 7,8 und 2 mM MgCl<sub>2</sub>. Die Ansätze wurden bei 85 °C für 0, 2 und 5 min inkubiert und durch schnelles Abkühlen auf Eis gestoppt. Zur Kontrolle wurden die Ansätze nur mit Puffer und Zellextrakt (also ohne

Substrat) sowie nur mit Puffer und Substrat (also ohne Zellextrakt) durchgeführt. Die Werte aus diesen Untersuchungen wurden von denen der Enzymreaktion abgezogen. Die Konzentration von freiem Phosphat wurde mit dem Phosphattest nach Howard und Ridley, 1990, bestimmt.

Phosphattest nach Howard und Ridley, 1990: 10 ml Ammoniummolybdat-Lösung (4,2 % Ammoniummolybdat in 4 M HCl) wurden mit 30 ml Malachitgrün-Lösung (0,05 % Malachitgrün in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ) vermischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1/40 Vol. einer 1,5 %igen TritonX-100-Lösung zugegeben (Endkonzentration 0,0375 %). Das fertige, gelbgrüne Phosphatreagens wurde in den Test eingesetzt. Für den Test wurden je 2x 2,5, 5 und 10  $\mu\text{l}$  der Testansätze auf 100  $\mu\text{l}$  mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  aufgefüllt und mit 750  $\mu\text{l}$  Phosphatreagens vermischt. In Gegenwart von Phosphat trat eine grünblaue Färbung auf. Nach 3 min wurde die Reaktion durch Zufuhr von 150  $\mu\text{l}$  34 %iger Zitronensäure abgestoppt. Die optische Dichte der Proben wurde bei 630 nm gemessen und mit den Werten einer Eichkurve (0, 2, 4, 6, 8, 10 nmol Phosphat) verglichen.

Fructose-1,6-Bisphosphatase: Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von 4 mM Fructose-1,6-Bisphosphat zum 85 °C heißen Reaktionsgemisch gestartet.

Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase: Die Enzymaktivität wurde in Richtung der Fructose-1,6-Bisphosphat-Bildung gemessen. Dazu wurde die Reaktion an die Aktivität der endogenen Fructose-1,6-Bisphosphatase gekoppelt, die Fructose-1,6-Bisphosphat dephosphoryliert. Glycerinaldehyd-3-Phosphat (8 mM) wurde zunächst für 10 min bei 25 °C in Gegenwart von 5 U Triosephosphat-Isomerase inkubiert, um gleiche Mengen von Dihydroxyaceton-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu erhalten. Anschließend wurde der Ansatz auf 85 °C erhitzt, und der Test durch die Zufuhr von Zellextrakt gestartet.

Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und Phosphoglycerat-Kinase: Der folgende Ansatz wies die Aktivitäten beider Enzyme nach, wobei die erhaltene spezifische Aktivität die der limitierenden Reaktion war. Es wurde die NAD(P)H- und MgATP-abhängige Freisetzung von anorganischem Phosphat aus 1,3-Bisphosphoglycerat über die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase verfolgt. Die Reaktion wurde an die Aktivität der endogenen Phosphoglycerat-Kinase gekoppelt, die 1,3-Bisphosphoglycerat aus 3-Phosphoglycerat und ATP bildet. Der Ansatz enthielt 0,5 mM NAD(P)H, 5 mM ATP und 5 mM 3-Phosphoglycerat. Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von 3-Phosphoglycerat gestartet. In der Kontrollreaktion ohne ATP wurde kein Phosphat freigesetzt. Das in der Kontrollreaktion mit ATP und ohne NAD(P)H freigesetzte Phosphat ( $20 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) wurde von den Werten der Enzymreaktion abgezogen.

### 5.5.5. Enzymtests gekoppelt an den Einbau $^{14}\text{C}$ -markierten Carbonats

Es wurde die Substrat-abhängige Fixierung von  $^{14}\text{C}$  aus [ $^{14}\text{C}$ ]-Bicarbonat in nicht flüchtige, säurestabile Produkte nach 1, 5 und 10-minütiger Inkubation bei 85 °C gemessen. Zu jedem Enzymtest wurden zwei Kontrollexperimente - Ansätze ohne Substrat bzw. Zellextrakt - durchgeführt. Die dabei erhaltenen Werte wurden von den Werten der Enzymreaktion abgezogen. Alle Ansätze wurden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch die Zufuhr von 20 µl 6 M HCl abgestoppt. Durch die starke Ansäuerung wurde gleichzeitig Bicarbonat in das flüchtige  $\text{CO}_2$  überführt. Das flüchtige, nicht fixierte  $^{14}\text{CO}_2$  wurde durch starkes, 3-stündiges Schütteln in Szintillationsgefäßen aus der Probe entfernt. Die Tests erfolgten mit Ausnahme der 2-Oxoglutarat bzw. Pyruvat:Akzeptor-Oxidoreduktase nach Hügler et al., 2003.

Bestimmung der Radioaktivität: 100 µl der Ansätze wurde mit 3 ml Szintillationscocktail (Rotiscint eco plus, Roth, Karlsruhe) versetzt. Anschließend wurde die Radioaktivität der Probe in einem Szintillationszähler (Tri Carb 2100TR, Packard, Meriden, USA) gemessen. Die Zählausbeute wurde über das Kanalverhältnis bestimmt. Sie lag bei 75–85 %. Die gemessenen Werte wurden entsprechend korrigiert.

Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase: Der Ansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM DTE, 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 37 kBq [ $^{14}\text{C}$ ]- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und 1 mM Ribulose-1,5-Bisphosphat. Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von Ribulose-1,5-Bisphosphat gestartet.

Acetyl-CoA und Propionyl-CoA-Carboxylase: Der Ansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 7,8, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM DTE, 4 mM ATP, 2 mM NADPH, 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 37 kBq [ $^{14}\text{C}$ ]- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und 0,4 mM Acetyl-CoA oder Propionyl-CoA. Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von Acetyl-CoA oder Propionyl-CoA gestartet.

2-Oxoglutarat und Pyruvat:Akzeptor-Oxidoreduktase: Der Austausch von  $^{14}\text{CO}_2$  in die Carboxylgruppe von 2-Oxosäuren in Abwesenheit von Elektronenakzeptoren ist charakteristisch für reversible 2-Oxoacid:Akzeptor-Oxidoreduktasen. Die Ansätze enthielten 100 mM Tris/HCl pH 7,8, 4 mM DTE, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 37 kBq [ $^{14}\text{C}$ ]- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und 3 mM 2-Oxoglutarat oder Pyruvat. In Kontrollexperimenten wurden 1 mM CoA oder 0,5 mM TPP zugeführt, jedoch ohne Effekt. Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von 2-Oxoglutarat oder Pyruvat gestartet.

Phosphoenolpyruvat (PEP)-Carboxylase: Der Ansatz enthielt 100 mM Imidazol/HCl pH 6,5, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM DTE, 2 mM NADH, 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 37 kBq [ $^{14}\text{C}$ ]- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und 2 mM PEP. Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von PEP gestartet.

PEP-Carboxykinase: Der Ansatz enthielt 100 mM Imidazol/HCl pH 6,5, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM DTE, 2 mM NADH, 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 37 kBq [ $^{14}\text{C}$ ]- $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 5 mM GDP und 2 mM PEP. Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von PEP gestartet.



Pyruvat-Carboxylase: Der Ansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 7,8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTE, 5 mM ATP, 2 mM NADH, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 37 kBq [<sup>14</sup>C]-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 2 mM Pyruvat. Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von Pyruvat gestartet. Die Fixierung von <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> über die Pyruvat:H<sub>2</sub>O-Dikinase oder die Pyruvat:Phosphat-Dikinase und anschließende PEP-Carboxylase oder PEP-Carboxykinase konnte von der Biotin-abhängigen Pyruvat-Carboxylase unterschieden werden, indem 1 mM Avidin zum Testansatz zugegeben wurde, und dieser für 5 min bei 25 °C vorinkubiert wurde. Avidin hemmt bei diesen Konzentrationen vollständig die Biotin-abhängige Pyruvat-Carboxylase (Herter et al., 2001).

Pyruvat:H<sub>2</sub>O-Dikinase (PEP-Synthetase): Es wurde die Pyruvat- und MgATP-abhängige Fixierung von <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> aus [<sup>14</sup>C]-Bicarbonat in säurestabile Produkte verfolgt. Das gebildete PEP wurde über die endogene PEP-Carboxylase zu Oxalacetat carboxyliert. Der Ansatz enthielt 100 mM 3-(Cyclohexylamino)-2-Hydroxy-Propan-Sulfonsäure (CAPSO) pH 8,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTE, 5 mM ATP, 2 mM NADH, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 37 kBq [<sup>14</sup>C]-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 2 mM Pyruvat. Die Reaktion wurde durch die Zufuhr von Pyruvat gestartet.

Pyruvat:Phosphat-Dikinase: Es wurde der gleiche Ansatz wie für die Messung der Pyruvat:H<sub>2</sub>O-Dikinase verwendet, jedoch wurden 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> zugegeben. Die zusätzliche Menge an fixiertem <sup>14</sup>C aus [<sup>14</sup>C]-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> nach dem Zusatz von Phosphat sollte auf die Aktivität der Pyruvat:Phosphat-Dikinase zurückzuführen sein.

### 5.6. Genomanalysen

Die Genomsequenz und die Annotierung des Genoms von *I. hospitalis* wurde von [http://genome.jgi-psf.org/draft\\_microbes/ign\\_k/ign\\_k.draft.html](http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/ign_k/ign_k.draft.html) bezogen. Zusätzlich wurden mit dem Programm "Clone Manager" (Scientific & Educational Software, Cary, USA) Blast-Analysen nach Genen für metabolische Enzyme durchgeführt, und die vorhandene Annotierung von Genen für metabolische Enzyme überprüft. Repräsentative Sequenzen, mit denen die Blast-Analysen durchgeführt wurden, wurden von der "Entrez Gene Datenbank" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=gene>) bezogen. Die Arbeiten mit dem Programm "Clone Manager" erfolgten durch Raffael Say, Diplomand am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Freiburg.

## 6. Lipidanalyse

### 6.1. Lipidextraktion und Aufbereitung für gaschromatographische Analysen

#### 6.1.2. Reinigung der Gebrauchsmaterialien

Alle Glasgeräte, bei deren Benutzung es nicht auf das genaue Volumen ankommt (Zentrifugenröhrchen, Glaspipetten, Aufbewahrungsgefäße...), sowie Alufolien und Porzellanmörser wurden bei 450 °C für 8 h inkubiert. Dadurch wurden sämtliche organische Substanzen (Fremdfette), die zu Kontaminationen führen könnten, verbrannt. Metallgegenstände (z.B. Spatel und Pipetten), Glasgeräte, deren Volumen konstant bleiben sollte (z.B. Spritzen und Messzylinder), und Teflongefäße wurden je dreimal mit Wasser, Methanol und Hexanol gespült. Auf diese Weise wurden hydrophile und lipophile Substanzen entfernt. Es wurde mit Nitrilhandschuhen gearbeitet, um eine Verunreinigung durch Hautfette oder Latex (von Latexhandschuhen) zu vermeiden.

#### 6.1.3. Lipidextraktion

In Vorversuchen (Jahn, 2003) wurden die Lipide standardmäßig nach Bligh und Dyer, 1959, extrahiert. Später zeigte sich jedoch, dass diese Extraktion, besonders bezüglich der Detektion der Tetraetherlipide, nicht ausreichend war: Ein weiterer Extraktionsschritt, nach Nishihara und Koga, 1987, war erforderlich. Die Lipidanalysen mussten folglich unter Einbeziehung des zweiten Extraktionsschrittes wiederholt werden.

Es wurden etwa 0,1 g gefriergetrocknete Zellen (entspricht ca. 0,5 g Nassgewicht) in die Lipidextraktion nach Bligh und Dyer, 1959, modifiziert durch Kates, 1986, eingesetzt. Zunächst wurden die Zellen in 4 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  resuspendiert. Dazu wurden 10 ml Methanol und 5 ml Chloroform gegeben. Das resultierende Gemisch war monophasisch. Die Probe wurde 20 min im Ultraschallbad (B-1200 E1, Branson, Shelton, USA) inkubiert. Anschließend wurde 10 min mit 4000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde aufbewahrt und der Niederschlag nochmals der selben Extraktion unterzogen. Auch dieser Überstand wurde aufbewahrt. Das Pellet des zweiten Extraktionsschrittes wurde einer dritten Extraktion unterzogen. Jedoch wurde dieses Mal statt 4 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  4 ml 1 %ige Trichloressigsäure verwendet. Der Überstand wurde aufbewahrt. Im Pellet befanden sich unlösliche Reste, die nach Nishihara und Koga, 1987, weiter aufgearbeitet wurden.

Zu den drei Überständen wurde je 4 ml Chloroform gegeben und kräftig geschüttelt. Anschließend wurden 5 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  zugegeben und erneut kräftig geschüttelt. Um die organische von der wässrigen Phase zu trennen, wurde die Probe 10 min bei 4000 g zentrifugiert. Die organischen Phasen der drei Fraktionen wurden abpipettiert, vereinigt und unter Stickstoff zur Trockne geblasen.

Das Pellet mit den unlöslichen Resten wurde einem weiteren Extraktionsschritt im Säuren, nach Nishihara und Koga, 1987, unterzogen. Dazu wurde es bei 95 °C über Nacht in 20 ml 37 %iger MeOH/CHCl<sub>3</sub>/HCl (10:1:1, v/v/v)-Lösung inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 4000 g) wurde die organische Phase des Überstands wie eben beschrieben (mit 4 ml Chloroform, 5 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und anschließender Zentrifugation) abgetrennt und zur Trockne geblasen. Durch die saure Extraktion werden stark membrangebundene Lipide, wie Tetraetherlipide, die nach der Bligh und Dyer-Extraktion im unlöslichen Rest geblieben sind, gelöst. Jedoch werden polare Kopfgruppen und säureempfindliche Kerne, wie Hydroxyarchaeol, hydrolysiert. Von diesen Lipiden sind folglich nur noch die Kerne intakt (Nishihara und Koga, 1987). Durch diese Methode wurde zusätzlich 10-20 % Material, vorwiegend Tetraetherlipide, erhalten.

### 6.1.4. Entfernen des Schwefels aus den Lipidfraktionen

Die Lipidextrakte enthielten große Mengen an Schwefel. Dieser wurde nach Jahnke et al., 2001, unter Verwendung elementaren Kupfers abgetrennt. Elementares Kupfer katalysiert durch sein hohes Redoxpotential die Reduktion von Schwefel zu Schwefelwasserstoff. Dabei wird Kupfer zu Kupferoxid oxidiert ( $\text{H}_2\text{O} + \text{Cu} + \text{S} \rightarrow \text{H}_2\text{S} + \text{CuO}$ ).

Käufliches Kupfer ist stark oxidiert und musste in die reduzierte Form überführt werden. Dazu wurden ca. 2 g Kupfer in 3 ml 4 M HCl geschwenkt. Bei Reduktion des Kupfers trat ein Farbwechsel von der dunklen, oxidierten Form in die orangegoldene leuchtende, reduzierte Form auf. Die Säure wurde durch Waschen in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> entfernt (Kontrolle mit pH-Papier). H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> wurde durch 3x Waschen mit Methanol entfernt. Anschließend wurde 3x mit Dichlormethan (DCM) und 3x mit Hexanol gewaschen, um Verunreinigungen durch Fette zu entfernen. Das reduzierte Kupfer wurde unter Stickstoff getrocknet.

Die getrockneten Lipide wurden in ca. 2 ml Chloroform inkl. 1/10 Vol. Methanol gelöst. Darauf wurde zunächst eine Spatelspitze Kupfer gegeben. Durch die Reduktion des Schwefels verfärbte sich das Kupfer dunkel. Es wurde solange weiter Kupfer zugegeben, bis sich das zuletzt zugegebene Kupfer auch nach einer Inkubationszeit von 15 min nicht mehr verfärbte. Schwarzer Staub aus oxidiertem Kupfer wurde entfernt, indem die Proben auf einen fettfreien Cellulosefilter in einer Glasmikropipette pipettiert wurden. Der schwarze Kupferoxidstaub blieb im Filter hängen. Die Kupferkörnchen wurden 3x mit Chloroform nachgewaschen, und die Waschflüssigkeit ebenfalls durch den Filter gereinigt.

Zur Berechnung des Lipidgehalts wurde die Gesamtmasse der Lipidextrakte (beider Extraktionsschritte) vor und nach der Entfernung von elementarem Schwefel bestimmt. Anschließend wurde sie mit der eingesetzten Zellmasse verglichen, von der der ermittelte Schwefelanteil abgezogen wurde.

## 6.2. Aufbereitung der Kohlenwasserstoffketten

Für die gaschromatographische Analyse der Kohlenwasserstoffketten der Lipide wurden diese vom Glycerol abgespalten und anschließend in die flüchtige Form überführt. Zunächst wurde je 1 mg der Lipidextrakte in 0,5 ml entwässertem DCM gelöst und mit 0,4 ml  $\text{BBr}_3$ -Lösung (1,0 M  $\text{BBr}_3$  in Methylenchlorid) für ca. 2 h bei 90 °C im Anoxischen (Gasphase  $\text{N}_2$ ) inkubiert. Dadurch werden die Kohlenwasserstoffketten vom Glycerol abgespalten und liegen als Alkylbromide vor (Summons et al., 1998). Die Reaktion wurde durch Zusatz von 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  abgestoppt. Darauf wurde 1 ml DCM zugespritzt. Nach Trennung der Phasen wurde die obere, organische Phase abgezogen. Die wässrige Phase wurde 3x mit 1 ml DCM nachgewaschen, und die organischen Phasen vereinigt. Zu den vereinigten organischen Phasen wurde 0,5 ml 'Superhydride' (Lithium-Triethylborhydrid) zugespritzt. Der Ansatz wurde für 2 h bei 70 °C im Anoxischen inkubiert. Dadurch wurden die Alkylbromide in die entsprechenden Kohlenwasserstoffe überführt. Nach Abstoppen der Reaktion mit 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  wurden die Lipide 2x in 1 ml DCM und 2x in 1 ml Hexan extrahiert. Die Mischung wurde zur Entwässerung durch eine Silicagel-Säule geschickt, die mit DCM nachgewaschen wurde. Das erhaltene Eluat wurde auf ein Volumen von ca. 150  $\mu\text{l}$  eingetrocknet.

In methodischen Vorversuchen (Jahn, 2003) wurde gezeigt, dass so präparierte Kohlenwasserstoffe geringe Mengen an einfach ungesättigten Kohlenwasserstoffen (Phytene und Biphytene) enthielten. Es bestand der Verdacht, dass es sich dabei um Artefakte der Oxidation mit  $\text{BBr}_3$  handelte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deswegen weitere Analysen durchgeführt. Von kleinen Mengen der Lipidextrakte wurden die Kohlenwasserstoffe mit 57 %iger HI (statt  $\text{BBr}_3$ ) abgespalten und anschließend mit 'Superhydride' reduziert.

Durch die Abspaltung der Ether mit  $\text{BBr}_3$  würden außerdem Hydroxygruppen an Kohlenwasserstoffen zunächst durch Br ersetzt und anschließend durch „Superhydride“ reduziert werden. In dieser Arbeit wurden deswegen die Kohlenwasserstoffketten alternativ mit BSTFA/Pyridin (analog zu der Derivatisierung der Zucker, siehe 6.3) derivatisiert.

## 6.3. Aufbereitung der Zuckeranteile

Zu 0,5 mg der getrockneten Lipidextrakte wurde 1 ml 1 M HCl gegeben. Die Proben wurden über Nacht bei 100 °C inkubiert, wodurch die einzelnen Zuckermoleküle freigesetzt wurden. Darauf wurden die Proben unter  $\text{N}_2$  zur Trockne geblasen. Zu den trockenen Proben wurden 25  $\mu\text{l}$  BSTFA inklusive 1 % TMCS und 25  $\mu\text{l}$  Pyridin pipettiert. Es folgten drei Stunden Inkubation bei 80 °C. TMCS wirkt als Katalysator und bewirkt die Trimethyl-Silylierung der Kohlenhydrate durch BSTFA. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Probe durch eine Silicagel-Säule geschickt, um Restmengen von HCl zu entfernen. Es wurde mit

2 ml DCM nachgewaschen. Das Eluat enthielt flüchtige (trimethyl-silylierte) Zucker. Es wurde zur Trockne eingeeengt, in ca. 150 µl DCM gelöst, und in die GC-MS Analyse eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Analysen waren mit denen der Vorversuche (Jahn, 2003) identisch und werden hier nur kurz der Vollständigkeit halber erwähnt.

### 6.4. Analyse der Kohlenwasserstoffketten und der Zucker

Die Analyse der Kohlenwasserstoffketten und der Zucker erfolgte nach Jahnke et al., 2001, in einem HP 6890 Gaschromatographen, der an ein HP 5973 Massenspektrometer gekoppelt war (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Der Gaschromatograph war mit einem Temperatur-programmierbaren, septumfreien Injektionssystem und einer Chrompack CP-Sil5CB Säule (Länge 60 m, Durchmesser 0,32 mm, Beschichtung 0,25 µm) ausgestattet. Die Proben wurden bei 40 °C eingespritzt. Diese Temperatur wurde 2 min lang gehalten. Dann wurde mit einer Rate von 10 °C min<sup>-1</sup> auf 120 °C, anschließend mit einer Rate von 4 °C min<sup>-1</sup> auf 320 °C aufgeheizt. Diese Temperatur wurde 50 min lang gehalten. Die gaschromatographisch aufgetrennten Moleküle wurden mittels Elektronenbeschuss fragmentiert, und die Fragmente im Massenspektrometer detektiert.

Um eine Quantifizierung der Kohlenwasserstoffe zu ermöglichen, wurde vor der Analyse eine definierte Menge C22-Standard zu den Proben gegeben. Anhand der Flächen unter den Peaks wurden die prozentualen Anteile der detektierten Kohlenwasserstoffe ermittelt.

Die Zucker wurden identifiziert, indem ihre Massenspektren und Retentionszeiten mit denen der folgenden Zuckerstandards verglichen wurden: Mannose, Glucose, Galaktose, Rhamnose und Xylose. Jeder Zucker zeigte 2 Peaks im Gaschromatogramm. Diese wurden durch die unterschiedlichen Retentionszeiten der α- und der β-Konformation eines Zuckers verursacht. Die Konformationen spiegeln nicht die tatsächlichen Verhältnisse in der Probe wider, sondern sind eine Folge der Derivatisierung.

### 6.5. Analyse des δ<sup>13</sup>C-Gehalts der Kohlenwasserstoffe

Der δ<sup>13</sup>C-Gehalt der Kohlenwasserstoffe wurde unter Verwendung eines ThermoFinnigan Trace Gaschromatographen durchgeführt, der an ein ThermoFinnigan MAT Delta XP Isotope Ratio Massenspektrometer gekoppelt war (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA). Der Gaschromatograph war mit einem programmierbaren split/splitless Injektionssystem ausgestattet, das im splitless Modus arbeitete. Die Auftrennung erfolgte an einer J&W DB-5MS-Säule (Länge 30 m, Durchmesser 0,25 mm, Beschichtung 0,25 µm) bei einer konstanten Flussrate von 2 ml min<sup>-1</sup>. Die Proben wurden bei 60 °C injiziert, darauf mit 10 °C min<sup>-1</sup> auf 150 °C, und anschließend mit 4 °C min<sup>-1</sup> auf 310 °C erhitzt. Diese Temperatur wurde für 30 min gehalten. Die Isotopenzusammensetzung wurde durch den Vergleich mit

einem co-injizierten, internationalen Standard bestimmt. Als Standard wurde VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite) verwendet. Die Werte der Isotopenzusammensetzung wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{Probe}} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{VPDB}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{VPDB}}} \times 1000 (\text{‰})$$

Die Isotopenzusammensetzung aller Peaks einschließlich der Standards war auf  $\pm 0.1 \text{ ‰}$  reproduzierbar.

## 6.6. Analyse der intakten polaren Lipide

Die intakten polaren Lipide wurden nach Sturt et al., 2004, analysiert.

Die flüssigchromatographische (LC-) Auftrennung erfolgte an einer LiChrospher® Diol-Säule (Länge 125 mm, Durchmesser 2 mm, Beschichtung 5  $\mu\text{m}$ , Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, USA) bei 30 °C im ThermoFinnigan Surveyor HPLC-System (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA). Der folgende lineare Gradient wurde aus den Laufmitteln A (Hexan/Isopropanol/Ameisensäure/14,8 M  $\text{NH}_3$ , 79:20:0,12:0,04, v/v/v/v) und B (Isopropanol/ $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ /Ameisensäure/14,8 M  $\text{NH}_3$ , 88:10:0,12:0,04, v/v/v/v) in 45 min mit einer Flussrate von 0,2  $\text{ml min}^{-1}$  angelegt: A (100 %) auf A/B (35:65, v/v). A/B (35:65, v/v) wurde darauf für 20 min zugeführt. Anschließend wurde für 1 h mit A gespült, um die Säule zu equilibrieren. Es wurden 60  $\mu\text{g}$  der Lipidextrakte und 100 pg der Standards injiziert.

Massenspektrometrische Analysen wurden mit dem ThermoFinnigan LCQ Deca XP ion trap Massenspektrometer (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) mit Electrospray Interface (ESI) durchgeführt. Das ESI wurde folgendermaßen programmiert: Kapillartemperatur 200 °C, Kapillarspannung  $\pm 11 \text{ V}$ , Hüllen-Gasfluss 40 (relative Einheiten), Düsenanspannung  $\pm 5 \text{ kV}$ . Für die Standardanalysen wurde das Massenspektrometer auf 'data dependent ion tree' gestellt, wobei der Hauptpeak jedes Scans (Scanbereich 500-2000  $m/z$ ) bis zu  $\text{MS}^3$  fragmentiert wurde. Separate Läufe mit positivem und negativem Ionenmodus lieferten ergänzende strukturelle Informationen. Die direkte Infusion der Lipidextrakte in die Elektrospray-Düse erlaubte eine tiefer gehende  $\text{MS}^n$ -Analyse. Die Kollisionsenergie wurde dabei manuell kontrolliert, um optimale Fragmentierung zu erhalten.

Wie in den Vorversuchen (Jahn, 2003) bemerkt wurde, konnte mit dieser Methode nicht sicher zwischen Phospholipiden und den um 2 Dalton schwereren Sulpholipiden unterschieden werden. Deswegen wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich hochauflösende LC-MS-Analysen mit einem Q-TOF Micro-Instrument (Waters, Milford, USA) im positiven Ionenmodus und unter denselben LC-Bedingungen wie gerade erwähnt an den beiden Lipidextrakten aller Proben durchgeführt.

## 7. Untersuchung der Histongene von *N. equitans*

### 7.1. Sequenzanalyse

Die Sequenzen der Histongene von *N. equitans* wurden von der "Entrez Gene Datenbank" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=gene>) bezogen.

Alignments mit anderen Histonsequenzen wurden im Programm "Bioedit Sequence Alignment Editor" erstellt. Sekundärstrukturen der Histone wurden mit Hilfe von "SwissModel" (<http://swissmodel.expasy.org>) berechnet und mit dem Programm "Deep View / Swiss-PdbViewer 3.7" bearbeitet.

### 7.2. DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte nach Muscholl et al., 1993. 0,1 g aufgereinigte *N. equitans*-Zellen wurden in 400 µl Puffer A (500 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM Na<sub>3</sub>Citrat) resuspendiert. Zum Zellaufschluss wurden 400 µl Puffer B (500 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 4 % w/v SDS) und 1 mg Proteinase K zugegeben. Der Ansatz wurde für 1 h bei 65 °C inkubiert. Die Lyse der Zellen wurde mikroskopisch überprüft. Bei unvollständiger Lyse wurde die Probe 3x eingefroren und wieder aufgetaut. Um Proteine und Histone, die für den Proteinase K-Abbau nicht zugänglich waren, von der DNA zu entfernen, wurden 130 µl 5 M NaCl-Lösung zupipettiert. Dazu wurden 100 µl CTAB/NaCl-Lösung (0,7 M NaCl, 10 % Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)) pipettiert, und der Ansatz nach gutem Mischen für 10 min bei 65 °C inkubiert. Um die Proteine zu fällen, wurde das Zelllysats mit 1 Vol. Phenol ausgeschüttelt. Zur Phasentrennung wurde für 8 min bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge (Heraeus Instruments GmbH, Hanau) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgezogen und zunächst mit 1 Vol. Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v), darauf mit 1 Vol. Chloroform:Isoamylalkohol (24:1, v/v) gewaschen. Die wässrige Phase wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 0,6 Vol. Isopropanol p.A. wurde die DNA über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach dem Abzentrifugieren der DNA (30 min, 13000 rpm) wurde der Niederschlag mit eiskaltem, 70 %igem Ethanol p.A. gewaschen, im Exsikkator getrocknet und in 20–25 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest, reinst</sub> (Lichrosolv<sup>®</sup>, vwr, Darmstadt) gelöst.

### 7.3. Analyse von DNA-Fractionen

#### 7.3.1. Größenbestimmung von DNA-Fragmenten

Die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung (85 V, 30-60 min) auf Agarosegelen (1 %, w/v, inkl. EtBr, 1 µg ml<sup>-1</sup>) in TAE-Puffer (Tris/Acetat pH 8,0, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA). Folgender Auftragspuffer wurde verwendet: 50 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 4 mM Harnstoff, 50 % (w/v) Saccharose, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau.

### 7.3.2. Konzentrationsbestimmung von DNA-Fraktionen

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Fraktionen erfolgte auf Ethidiumbromidplatten. Agarose (1 %, w/v) wurde durch Kochen in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurde Ethidiumbromid (5 µg ml<sup>-1</sup>) zugesetzt, und die Agaroseplatten gegossen. Die erstarrten Platten wurden bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde zunächst je 1 µl verschiedener DNA-Lösungen mit bekannten Konzentrationen (6,25, 12,5, 25, 50, 100 ng/µl) auf die Ethidiumbromidplatte pipettiert. Anschließend wurde 1 µl der DNA-Lösung unbekannter Konzentration auf die Ethidiumbromidplatte pipettiert. Durch den Vergleich der Fluoreszenzstärken im UV-Licht konnte die Konzentration der Probe abgeschätzt werden.

### 7.4. Amplifikation und Aufreinigung der Histongene

Die Histongene wurden unter Verwendung spezifischer Primer (1.2) mittels PCR in einem Thermocycler der Firma Thermodux (Progene-02, Thermo-Dux, Wertheim) amplifiziert. Folgender PCR-Ansatz wurde in 0,2 ml Reaktionsgefäße (PeqLab, Erlangen) pipettiert:

10x PCR-Puffer inkl. MgCl <sub>2</sub>	5 µl
dNTP-Mix (je Nukleotid 10 mM)	4 µl
Vorwärts-Primer (25 ng µl <sup>-1</sup> )	2 µl
Rückwärts-Primer (25 ng µl <sup>-1</sup> )	2 µl
DNA (insgesamt 20 ng)	x µl
Taq-Polymerase (5 U µl <sup>-1</sup> )	0,25 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest, reinst</sub>	ad 50 µl

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

1. 10 min 95 °C (Denaturierung)
2. 1 min 95 °C (Denaturierung)
3. 1 min 60 °C (Annealing)
4. 2 min 72 °C (DNA-Polymerisierung)
5. 10 min 72 °C (DNA-Polymerisierung)
6. hold 4 °C (Kühlen)

Schritt 2, 3 und 4 wurden in 35 Zyklen hintereinander durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde über Agarosegelelektrophorese überprüft (7.3.1) Die Aufreinigung und Aufkonzentrierung erfolgte nach Angaben des Herstellers über den QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe der Ethidiumbromidplatte (7.3.2).



## 7.5. Restriktion und Ligation von PCR-Produkt und pET16b

An den erhaltenen Histongenen (mit eingefügten Restriktionsschnittstellen) und dem Plasmid pET16b (Novagen, Madison, USA) wurden Doppelverdaus mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und XhoI durchgeführt. Dazu wurden folgende Ansätze für 90 min bei 37 °C inkubiert:

pET 16b oder PCR-Produkt (100 ng $\mu\text{l}^{-1}$ )	7 $\mu\text{l}$
10x Restriktionspuffer	1 $\mu\text{l}$
NdeI	1 $\mu\text{l}$
XhoI	1 $\mu\text{l}$

Die Ansätze wurden anschließend für 1 h bei 80 °C inkubiert, um die Restriktionsenzyme zu inaktivieren. Darauf erfolgte die Ligation der PCR-Produkte mit pET16b bei 16 °C über Nacht in folgendem Ligationsansatz:

Plasmid (verdaut)	50 ng
PCR-Produkt (verdaut)	X ng
10x Puffer	1 $\mu\text{l}$
T4 DNA-Ligase	2 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O <sub>bidest, reinst</sub>	ad 10 $\mu\text{l}$

Die Menge an eingesetztem PCR-Produkt wurde nach folgender Formel berechnet:

$$X \text{ ng PCR-Produkt} = \frac{(Y \text{ bp PCR-Produkt}) \times (50 \text{ ng PCR-Vektor})}{(Z \text{ bp Vektor})}$$

## 7.6. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

*E. coli*-Zellen wurden nach Hannahan, 1983, mit Rubidiumchlorid für die Aufnahme von DNA kompetent gemacht.

50-fach SOC-Lösung	Glucose	3,96 g
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,46 g
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	2,03 g
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 20 ml
Trafo-Puffer I	Rubidiumchlorid	6 g
	MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	4,95 g
	KAc	1,47 g
	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,75 g
	Glycerin (87 %)	75 g
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 500 ml

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt.

Trafo-Puffer II	MOPS (0,5 M)	4 ml
	Rubidiumchlorid	0,24 g
	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	2,2 g
	Glycerin	30 g
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 200 ml

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 6,8 eingestellt.

2 ml einer Übernacht gewachsenen *E. coli*-Kultur wurden in der Tischzentrifuge (5 min, 4 °C, 13000 rpm, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 100 ml SOB- und 2 ml 50 x SOC-Lösung aufgenommen und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4 wurde die Kultur 15 min auf Eis gekühlt und anschließend abzentrifugiert (5 min, 4 °C, 6500 rpm, SS34-Rotor, Sorvall Superspeed RC2-B). Der Zellschlag wurde in 11,4 ml kaltem Trafo-Puffer I resuspendiert, 5 min bei 6500 rpm und 4 °C abzentrifugiert und anschließend in 2,9 ml eisgekühltem Trafo-Puffer II aufgenommen. Die nun kompetenten Zellen wurden in 50 µl Aliquots portioniert und bei -70 °C aufbewahrt.

### 7.7. Transformation und Vervielfältigung der Fusionsplasmide

1-2 µl des Ligationsansatzes wurden zu 50 µl kompetenter *E. coli* DH5α-Zellen pipettiert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde ein Hitzeschock durchgeführt (45 sek bei 42 °C), worauf die Zellen erneut 5 min auf Eis inkubiert wurden. Darauf wurden 800 µl 37 °C warmes LB-Medium zugegeben, und die Zellen bei 37 °C für 45 min inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Zellen (5 min, 4 °C, 13000 rpm, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) wurden sie in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Platten ausplattiert. Auf diese LB-Platten wurde zuvor 100 µl Ampicillinlösung (10 mg ml<sup>-1</sup>) ausplattiert. Dies bewirkte eine Selektion auf die *E. coli*-Zellen, die das Plasmid aufgenommen und dadurch eine Ampicillinresistenz erworben hatten. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden pro Präparation je 10 Einzelkolonien gepickt, in Reagenzgläser mit 10 ml LB-Medium inkl. Ampicillin (100 µg ml<sup>-1</sup>) überimpft und über Nacht bei 37 °C im Rollerdrum inkubiert.

### 7.8. Plasmidisolierung und Kontrolle

Aus den in Reagenzgläsern kultivierten *E. coli*-Zellen wurden die Plasmide mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden) isoliert. Darauf wurde überprüft, ob die Ligation erfolgreich war, und die Plasmide tatsächlich ein Insert (PCR-Produkt) aufgenommen hatten. Dazu wurden PCR Analysen (7.4) durchgeführt, zum einen mit Primern, die spezifisch für das Insert waren (Neq288F und Neq288R bzw. Neq348F und Neq348R), zum anderen mit Primern, die außerhalb des Inserts am Plasmid banden (T7 Prom und T7 Term). Die PCR-Produkte wurden über Agarosegelelektrophorese (7.3.1) analysiert.

## 7.9. Sequenzierung und Auswertung der Sequenzen

Von Plasmiden mit Insert wurde, ausgehend von den T7-Promotor und Terminator-Sequenzen, eine Sequenzierung des Inserts angefertigt (je 3 pro Ligationsansatz). Die Sequenzierung wurde von der Firma Entelechon, Regensburg, durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm "BioEdit" überprüft. Anschließend wurde mit dem Programm "pDraw32 1.1.88" überprüft, ob die Gensequenz im Leserahmen des Plasmids lag. Waren beide Anforderungen erfüllt, wurde das Plasmid in kompetente *E. coli*-Expressionsstämme transformiert.

## 7.10. Expression in *E. coli*-Expressionsstämmen

Zur Expression der Gene wurden die Plasmide wie in 7.6 beschrieben in kompetente *E. coli*-Expressionsstämme transformiert. Zunächst wurde getestet, welcher Stamm und welche Expressionsbedingungen für das jeweilige Insert optimal waren. Folgende Stämme wurden getestet: Rosetta<sup>TM</sup>, Rosetta-gami<sup>TM</sup>, BL21 (DE3)pACYC-RIL und C43 (DE3) Walker. Die Expression erfolgte in LB-Medium inkl. Ampicillin (100 µg ml<sup>-1</sup>) und dem für den jeweiligen Expressionsstamm erforderlichen Antibiotikum (3.2.1.). Die Expression wurde bei 37 °C, 30 °C (für je 4 h) und 18 °C (über Nacht) getestet. Bei 30 und 37 °C wurden alle 60 min Proben (40 µl) entnommen, bei 18 °C nach 2 und 14 h. Diese wurden per SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot analysiert (4.1 und 4.2).

## 7.11. Aufreinigen der rekombinanten Histone

1,5 g gefrorene *E. coli*-Zellen wurden in 7,5 ml BugBuster<sup>TM</sup> protein extraction reagent (Novagen, Madison, USA) resuspendiert, dem zum Abbau unerwünschter Nukleinsäuren 187,5 U Benzoase Nuklease (Novagen) zugesetzt wurden. Zur Hemmung unerwünschter Protease-Aktivität wurde dem Ansatz 0,1 mM PMSF zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte durch 1-stündiges Schütteln bei Raumtemperatur.

Bei rNEQ288 wurden die Zellfragmente darauf für 1 h bei 4500 rpm abzentrifugiert (Rotor 8179, Kendro Labofuge 400R, Heraeus, Osterode). Der Überstand wurde mit Ni<sup>2+</sup>-NTA vermischt.

Bei rNEQ348 wurde für 30 min bei 4500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde einem Hitzeschritt im Wasserbad unterzogen (30 min, 80 °C), der zu einer Denaturierung von *E. coli*-Proteinen führte. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (1 h bei 4500 rpm) wurde dieser Überstand mit Ni<sup>2+</sup>-NTA vermischt.

Binde-Puffer:	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	10 mM

Der pH-Wert wurde unmittelbar vor Gebrauch auf pH 8,0 eingestellt.

Waschpuffer:	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	20 mM

Der pH-Wert wurde unmittelbar vor Gebrauch auf pH 8,0 eingestellt.

Elutionspuffer:	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	250 mM

Der pH-Wert wurde unmittelbar vor Gebrauch auf pH 8,0 eingestellt.

In einem 15 ml Falcontube wurde zuvor 0,5 ml 50 % Ni<sup>2+</sup>-NTA Resin (Novagen, Madison, USA) mit 4 ml Bindepuffer äquilibriert. Nach Sedimentation des Säulenmaterials wurde der Bindepuffer durch Überstand ersetzt, und die Probe mind. 1 h bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Darauf wurde das Ni<sup>2+</sup>-NTA auf eine 10 ml Säule (Novagen) gepackt. Die nicht gebundenen Proteine wurden durch Waschen mit 10 ml Waschpuffer entfernt. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgt mit 2 ml Elutionspuffer. Das Eluat wurde in 4x 0,5 ml Fraktionen gesammelt, und diese bei 4 °C aufbewahrt.

### 7.12. Oligomerisierungsstudien

Oligomerisierungsstudien wurden in 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, pH7,8 (eingestellt bei Raumtemperatur), durchgeführt. Die Proteine wurden über Nacht gegen diesen Puffer dialysiert, in verschiedenen Konzentrationen miteinander gemischt (endgültiges Reaktionsvolumen 30 µl) und für 30 min bei 70 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde dem Überstand Glutaraldehyd mit einer Endkonzentration von 0,005 % zugegeben. Die Probe wurde für darauf 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Analyse der Proteinfractionen erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot mit Anti-HisTag-Antikörpern (4.1 und 4.2). Zur Kontrolle wurde dasselbe Experiment nach Abspaltung des HisTags von den Histonen mit dem Faktor Xa durchgeführt.

### 7.13. DNA-Binde- und Kompaktierungsstudien

Vor Durchführung der Kompaktierungsstudien wurde der HisTag von den rekombinanten Histonen mit dem Faktor Xa (Novagen) nach Angaben des Herstellers abgespalten. Ein linearisiertes Plasmid (pET16b, verdaut mit EcoRI) wurde mit den Histonen bei 70 °C für 30 min in 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, pH 7,8, inkubiert. Mit den DNA-Proteinkomplexen wurden anschließend Gelshift-Experimente durchgeführt. Dazu wurden die Fraktionen auf einem 1 %igen Agarose-Gel (inkl. 1 µg ml<sup>-1</sup> EtBr) für 1 h bei 85 Volt aufgetrennt.

## III. Ergebnisse

### 1. Stoffwechselwege in *Ignicoccus hospitalis*

In *I. hospitalis* wurden verschiedene biosynthetische Prozesse analysiert. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der CO<sub>2</sub>-Fixierung und der Biosynthese von Intermediaten des zentralen Kohlenstoffmetabolismus. Zusätzlich wurden der Kohlenhydratstoffwechsel und die Biosynthese verschiedener Aminosäuren untersucht.

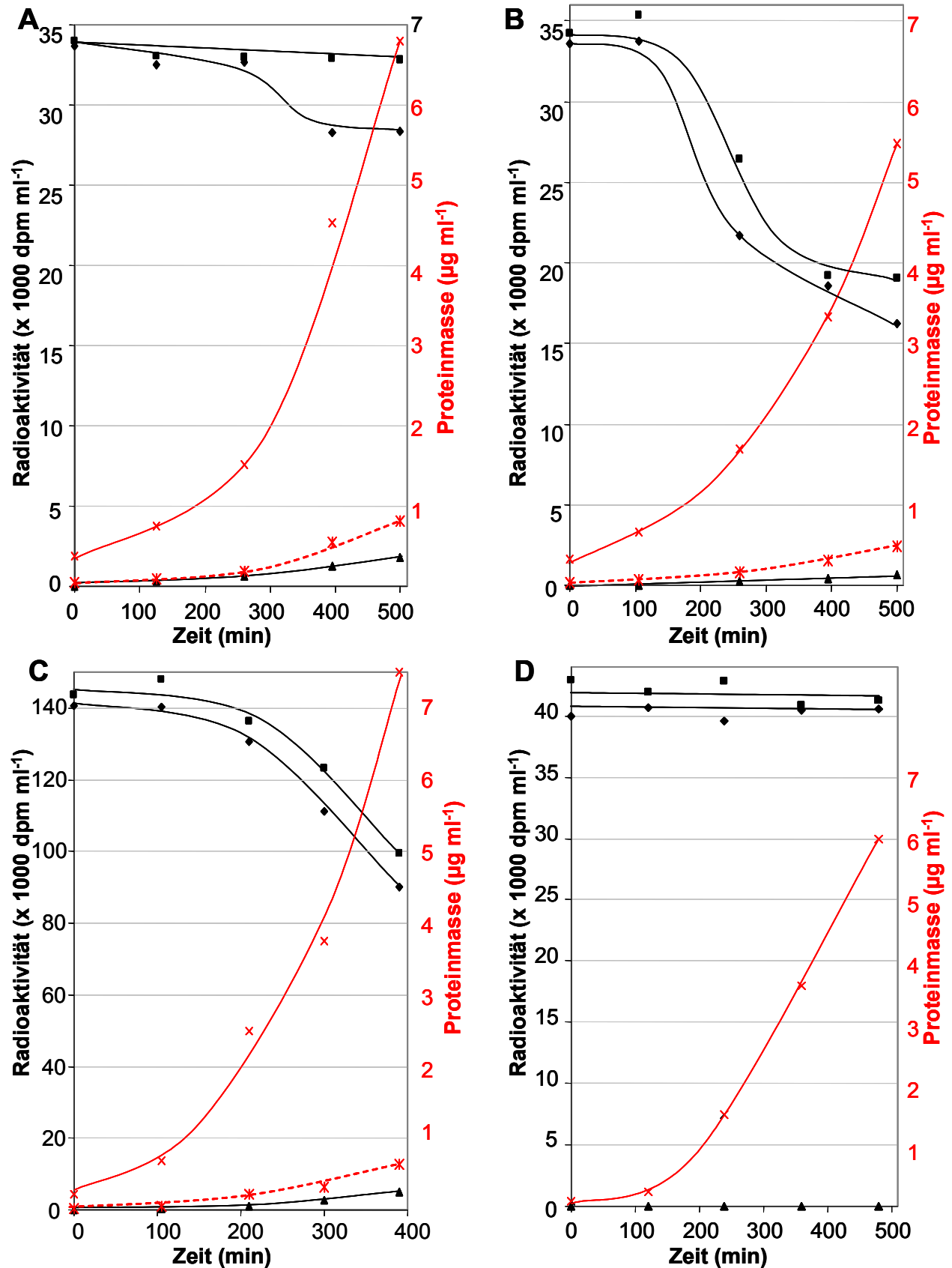
Die Stoffwechselwege in *I. hospitalis* wurden mit drei verschiedenen Methoden erforscht. Zum einen wurden Enzymtests mit Zellextrakten autotroph kultivierter *I. hospitalis*-Zellen durchgeführt. Diese Tests fanden unter anoxischen Bedingungen bei 75 °C im beheizbaren Photometer oder bei 85 °C im Wasserbad statt. Des Weiteren wurde die öffentlich zugängliche Genomsequenz von *I. hospitalis* ([http://genome.jgi-psf.org/draft\\_microbes/ign\\_k/ign\\_k.draft.html](http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/ign_k/ign_k.draft.html)) auf Gene hin untersucht, die vermutlich für Enzyme der zentralen Stoffwechselwege kodieren. Dabei wurde nicht nur die auf dieser Seite aufgeführte Annotation berücksichtigt, sondern zusätzlich im Genom mit dem Programm "clone manager" nach Stoffwechsel-Genen gesucht, und bereits annotierte Gene überprüft. Schließlich wurden retrobiosynthetische Analysen an <sup>13</sup>C-markierten Aminosäuren durchgeführt.

#### 1.1. Methodische Vorversuche:

##### Inkorporation von organischen Substraten

Um <sup>13</sup>C-Markierungen an Aminosäuren von *I. hospitalis*-Zellen zu erhalten, wurden diese auf <sup>13</sup>C-markierten, organischen Substraten kultiviert. Zuvor musste geklärt werden, ob bzw. welche organischen Substrate von den obligat autotrophen *I. hospitalis*-Zellen aufgenommen werden. Dazu wurden die Zellen in Gegenwart von <sup>14</sup>C-markierten Substraten - Acetat, Pyruvat, Succinat oder Glucose - unter sonst autotrophen Bedingungen kultiviert. Während des Wachstums wurden Proben genommen, und daraus die Radioaktivität des bewachsenen Mediums, der abzentrifugierten Zellen und des zellfreien Mediums ermittelt.

Die Generationszeit von *I. hospitalis* betrug bei allen Experimenten etwa 60 min. Das Wachstum der Kulturen wurde am Ende der logarithmischen Wachstumsphase, bei einer Zellkonzentration von ca. 6x10<sup>6</sup> Zellen ml<sup>-1</sup>, gestoppt. Abb. 2 zeigt die Aufnahme der markierten organischen Substrate durch *I. hospitalis*-Zellen. Dargestellt sind die gemessene Radioaktivität im bewachsenen Medium (*I. hospitalis*-Zellen + Medium), im Zellpellet (abzentrifugierte *I. hospitalis*-Zellen) und im zellfreien Medium, im Verhältnis zur zunehmenden Proteinmasse der wachsenden *I. hospitalis*-Zellen. Der berechnete Anteil der Proteinmasse, der aus der zugegebenen organischen Substanz stammt, ist ebenfalls eingezeichnet.



**Abb. 2 A-D:** Einbau <sup>14</sup>C-markierter, organischer Substrate in wachsende *I. hospitalis*-Zellen.

**A:** [1-<sup>14</sup>C]Acetat, **B:** [1,4-<sup>14</sup>C]Succinat, **C:** [3-<sup>14</sup>C]Pyruvat, **D:** [U-<sup>14</sup>C]Glucose.

Radioaktivität (dpm ml<sup>-1</sup>) im bewachsenen Medium (■), im Überstand/zellfreien Medium (♦) und in den abzentrifugierten Zellen (▲), im Verhältnis zur Proteinmasse (µg ml<sup>-1</sup>) der wachsenden *I. hospitalis*-Kultur. Die durchgehende rote Linie zeigt die gesamte Proteinmasse (x), die gestrichelte rote Linie den Anteil der Proteinmasse, der aus der zugegebenen organischen Substanz stammt (x).

In den Ansätzen mit Acetat, Pyruvat und Succinat wurde eine kontinuierliche Abnahme der Radioaktivität im zellfreien Medium ermittelt. Gleichzeitig nahm die Radioaktivität im Zellpellet zu. Dies zeigt, dass eine Inkorporation der verschiedenen markierten Substanzen aus dem Medium in die *I. hospitalis*-Zellen stattgefunden hat. Am Ende der logarithmischen Wachstumsphase waren 5,2 % des markierten Acetats, 3,5 % des markierten Pyruvats und 1,9 % des markierten Succinats in das Zellmaterial eingebaut.

In den Experimenten mit Pyruvat und Succinat trat ein Gesamtverlust der Radioaktivität in Höhe von 31 % bzw. 44 % auf. Dieser wurde wahrscheinlich durch die Freisetzung von flüchtigem  $^{14}\text{CO}_2$  aus den markierten Substanzen in die Gasphase verursacht. Die Gasphase wurde in den Radioaktivitätsbestimmungen nicht berücksichtigt. In den späteren Kapiteln wird gezeigt, dass verschiedene Stoffwechselreaktionen in *I. hospitalis*, wie die Synthese von 2-Oxoglutarat, zu einer Freisetzung von  $\text{CO}_2$  führen. Auch die  $\text{CO}_2$ -Fixierungsreaktionen, die vermutlich von *I. hospitalis* durchgeführt werden (siehe III.1.2), sind reversible Gleichgewichtsreaktionen. Sie könnten bei einem Produktüberschuss (Pyruvat bzw. Oxalacetat, welches aus Succinat gebildet werden kann) in entgegen gesetzter Richtung ablaufen und zur  $\text{CO}_2$ -Freisetzung führen.

Im Ansatz mit Glucose wurde zu allen Messzeiten eine gleich bleibende Radioaktivität im zellfreien Medium gemessen. Auch wurde keine Zunahme der Radioaktivität im Zellpellet verzeichnet (Abb. 2 D). Dies zeigt, dass unter den Testbedingungen kein Einbau von Glucose in *I. hospitalis* erfolgte.

Aus der gemessenen Radioaktivität im Zellpellet und den bekannten spezifischen Radioaktivitäten ( $\text{kBq mM}^{-1}$ ) der Substanzen wurde die Kohlenstoffmasse im *I. hospitalis*-Pellet berechnet, die von der jeweiligen zugesetzten organischen Substanz stammte (siehe Tab. 1). Darauf wurde die Kohlenstoffmasse aus der zugesetzten Substanz mit der gesamten Kohlenstoffmasse der Zellen verglichen. Es wurde vorausgesetzt, dass die Masse des Zellproteins der Masse des Zellkohlenstoffs entspricht, und diese je 50 % der Trockenzellmasse ausmachen. Unter den genannten Kultivierungsbedingungen trug Acetat zu 11,6 %, Pyruvat zu 8,5 % und Succinat zu 8,8 % zum Zellkohlenstoff von *I. hospitalis* bei (Tab. 1). Der Rest des Zellkohlenstoffs sollte durch die  $\text{CO}_2$ -Fixierung erhalten worden sein.

### III. Ergebnisse

Tabelle 1: Einbau von  $^{14}\text{C}$ -markierten, organischen Substraten in den Zellkohlenstoff von *I. hospitalis* am Ende der logarithmischen Wachstumsphase.

Zugesetzte markierte Substanz (je 0,5 mM in 250 ml Medium)	Spezifische Radioaktivität	Zellmasse ( $\mu\text{g Protein ml}^{-1}$ )	$^{14}\text{C}$ im Zellpellet ( $\text{dpm ml}^{-1}$ )	$\mu\text{g C}$ im Zellpellet aus der zugesetzten, markierten Substanz ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Prozent (%) Zellkohlenstoff aus der markierten Substanz
[1- $^{14}\text{C}$ ]Acetat (630 kBq)	68 dpm $\text{nmol}^{-1}$	5,4	1782	0,629	11,6
[3- $^{14}\text{C}$ ]Pyruvat (140 kBq)	300 dpm $\text{nmol}^{-1}$	7,2	5127	0,615	8,5
[1,4- $^{14}\text{C}$ ]Succinat (140 kBq)	68 dpm $\text{nmol}^{-1}$	5,4	670	0,473	8,8

Die Vorversuche zeigten, dass das obligat autotrophe Archaeum *Ignicoccus hospitalis* offensichtlich bis zu einem gewissen Ausmaß dazu fähig ist, extern zugeführte, organische Kohlenstoffquellen aufzunehmen. Die Inkorporation von Acetat erfordert ein Acetat-aktivierendes Enzym. Mögliche Gene für eine Acetat-CoA-Ligase (AMP-bildend, Gene 250 und 251) wurden im Genom entdeckt, jedoch nicht die Gene für eine Acetat-Kinase und eine Phosphotransacetylase. Die Aufnahme von Pyruvat und Succinat erfordert keine Aktivierung und könnte durch passive Diffusion erfolgen. Aufnahme von Pyruvat durch passive Diffusion wurde schon bei *Methanosarcina barkeri* nachgewiesen (Bock et al., 1993). Succinat liegt ab pH 5,6 als zyklisches Monoanion vor, in dem die Ladung maskiert wird. Somit kann es bei pH 5,5-6 durch Lipidmembranen diffundieren (Kaim et al., 1998, 1999). Glucose wurde nicht von *I. hospitalis* aufgenommen.

Entsprechend den Ergebnissen dieser Vorversuche wurden die  $^{13}\text{C}$ -Markierungen an den Aminosäuren von *I. hospitalis* mit [1- $^{13}\text{C}$ ]Acetat durchgeführt. *I. hospitalis* wurde im Großmaßstab (100 l) für mehr als sechs Generationszeiten in Gegenwart von 0,5 mM [1- $^{13}\text{C}$ ]Acetat kultiviert. Anschließend wurden die Aminosäuren aus den geernteten Zellen isoliert. Mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie wurde darauf die  $^{13}\text{C}$ -Markierung in den einzelnen Kohlenstoffatomen der verschiedenen Aminosäuren analysiert. Durch retrobiosynthetische Analysen der  $^{13}\text{C}$ -markierten Aminosäuren konnten die Markierungsmuster der Aminosäurevorstufen und somit von Intermediaten der zentralen Stoffwechselwege zurückverfolgt werden (nach Bacher et al., 1999). Dies ermöglichte Einblicke in die metabolischen Netzwerke von *I. hospitalis*. Auf das Prinzip der retrobiosynthetischen Analyse und die damit erhaltenen Ergebnisse wird im Folgenden bei der Aufstellung der verschiedenen untersuchten Stoffwechselwege ( $\text{CO}_2$ -Fixierung, Kohlenhydratbiosynthese, Aminosäurebiosynthese) eingegangen.



## 1.2. CO<sub>2</sub>-Fixierung und zentraler Kohlenstoffmetabolismus

Der Kohlenstoffmetabolismus autotropher Organismen setzt die Fixierung von CO<sub>2</sub> voraus. In diesem Prozess wird anorganischer Kohlenstoff in niedermolekulare, organische Kohlenstoffbausteine umgewandelt, welche für Biosynthesewege in der Zelle zur Verfügung stehen.

### 1.2.1. Berechnung der erforderlichen spezifischen Aktivität CO<sub>2</sub>-fixierender Enzyme

Unter optimalen Wachstumsbedingungen (90 °C, 1 % S°, pH 5,5-6,0, H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> = 80:20, v/v bei 250 kPa) beträgt die Verdopplungszeit autotroph gezüchteter *I. hospitalis* Zellen etwa 60 min. Für die Enzymtests wurden Zellen verwendet, die sich beim Übergang in die stationäre Phase befanden und somit eine verminderte Verdopplungszeit von etwa 2 h aufwiesen. Für die Berechnung der erforderlichen spezifischen Aktivität CO<sub>2</sub>-fixierender Enzyme wurde vorausgesetzt, dass 50 % der Trockenzellmasse von *I. hospitalis* zum einen der Proteinmasse, zum anderen der Kohlenstoffmasse entsprechen. Die erforderliche Enzymaktivität wurde mit folgender Formel berechnet:

$$dS/dt \text{ (mg Protein)}^{-1} = \text{Substratverbrauch min}^{-1} \text{ (mg Protein)}^{-1} = \mu \times a^{-1} \times b \times c^{-1}$$

wobei:  $\mu = \ln 2 / t_d$ ;  $t_d$  = Generationszeit  $\approx 120$  min

$$\Rightarrow \mu = 0,69 / 120 \text{ min} = 0,005 \text{ min}^{-1}$$

**a** = Zellausbeute pro CO<sub>2</sub> = 12 g Protein/mol CO<sub>2</sub> = 24 g Zellen (trocken)/mol CO<sub>2</sub>

**b** = 1 g Zellmasse (trocken)

**c** = Proteinmasse in 1 g Zellen = 500 mg

$$d\text{CO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} = 0,005 \text{ min}^{-1} \times (24 \text{ g/mol})^{-1} \times 1 \text{ g} \times (500 \text{ mg})^{-1} = 0,4 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ (mg Protein)}^{-1}$$

Folglich müssen die Aktivitäten der CO<sub>2</sub>-fixierenden Enzyme in Zellextrakten der hier verwendeten *I. hospitalis*-Zellen zusammen mindestens 0,4  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ (mg Protein)}^{-1}$  betragen.

### 1.2.2. Enzymaktivitäten in Zellextrakten von *I. hospitalis*-Zellen

#### 1.2.2.1. Aktivitäten von Schlüsselenzymen der bekannten CO<sub>2</sub>-Fixierungswege

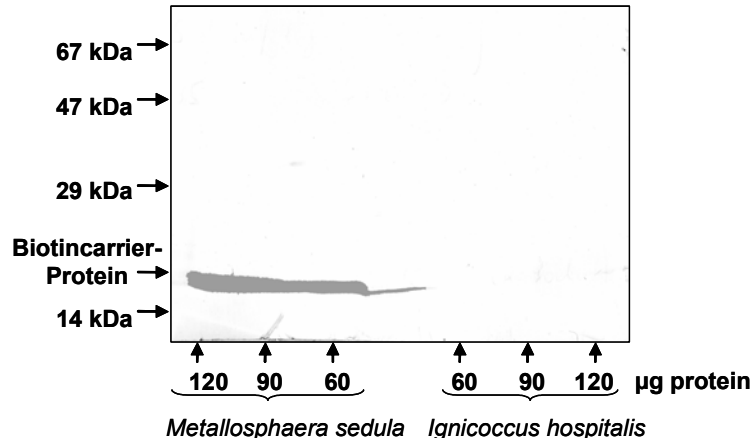
Zellextrakte von *I. hospitalis* wurden auf die Aktivitäten von Enzymen hin untersucht, die als charakteristisch für die vier bekannten CO<sub>2</sub>-Fixierungswege gelten.

Calvin-Zyklus: Die Aktivität der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCo), das Schlüsselenzym des Calvin-Zyklus, wurde getestet, indem man die Ribulose-1,5-Bisphosphat abhängige Fixierung von <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in säurestabile Produkte untersuchte. Die spezifische Aktivität bei 80 °C war unter 1 nmol min<sup>-1</sup> (mg Protein)<sup>-1</sup>.

Reduktiver Acetyl-CoA-Weg: Die Aktivitäten der Schlüsselenzyme des reduktiven Acetyl-CoA-Wegs, Kohlenmonoxid-Dehydrogenase und Formiat-Dehydrogenase, wurden mit Methylviologen als artifiziellem Elektronenakzeptor getestet. Sie lagen beide unter  $1 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ .

3-Hydroxypropionat-Zyklus: Die Acetyl-CoA/Propionyl-CoA-Carboxylase wird als Schlüsselenzym eines modifizierten 3-Hydroxypropionat-Zyklus in Mitgliedern der crenarchaeellen Ordnung Sulfolobales angesehen. Deswegen wurden Zellextrakte von *I. hospitalis* bei  $85^\circ\text{C}$  auf die Mg-ATP und Acetyl-CoA bzw. Propionyl-CoA abhängige Fixierung von  $^{14}\text{CO}_2$  in säurestabile Produkte untersucht. Diese Aktivitäten wurden jedoch nicht detektiert. Auch wurden keine Aktivitäten der Malonyl-CoA-Reduktase oder der Propionyl-CoA-Synthase entdeckt ( $< 1 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ ), welche ebenfalls charakteristische Enzyme dieses Weges sind.

In Zellextrakten von *I. hospitalis* wurde zudem mit der Avidin-Technik nach Biotinproteinen wie der Acetyl-CoA/Propionyl-CoA-Carboxylase oder der Pyruvat-Carboxylase gesucht. Abb. 3 demonstriert, dass in Extrakten von *I. hospitalis* keine Biotin enthaltende Proteinbande detektiert wurde. Im Gegensatz dazu färbte die Positivkontrolle, das 18,6 kDa große Biotincarrier-Protein der Acetyl-CoA/Propionyl-CoA-Carboxylase im Zellextrakt von *Metallosphaera sedula*, stark.



**Abb. 3:** Biotinfärbung von Zellextrakten von *Ignicoccus hospitalis* und *Metallosphaera sedula* nach Auftrennung auf einem 16 %igen SDS-Polyacrylamidgel und anschließendem Western-Blot. Der Zellextrakt von *M. sedula* zeigte eine starke Färbung bei etwa 20 kDa. Diese Bande repräsentiert höchstwahrscheinlich das 18,6 kDa große Biotincarrier-Protein der Acetyl-CoA-Carboxylase.

Reduktiver TCA-Zyklus: Die Mitglieder der crenarchaeellen Ordnung Thermoproteales nutzen den reduktiven TCA-Zyklus zur  $\text{CO}_2$ -Fixierung. Als Schlüsselenzyme dieses Zyklus gelten die 2-Oxoglutarat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase und die ATP-Citrat-Lyase. Durch die durchgeführten enzymatischen Analysen kann nicht bestimmt werden ob *I. hospitalis* tatsächlich Ferredoxin als elektronenübertragenden Cofaktor der beiden Oxidoreduktasen nutzt. Deswegen werden diese Enzyme hier als 2-Oxoglutarat- bzw. Pyruvat:Akzeptor-Oxidoreduktasen bezeichnet.

Die Aktivität der 2-Oxoglutarat:Akzeptor-Oxidoreduktase lag unter  $1 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ . Zellextrakte von *I. hospitalis* katalysierten weder die 2-Oxoglutarat und CoA abhängige Reduktion des artifiziellen Elektronenakzeptors Methylviologen (gemessen bei  $75^\circ\text{C}$ ), noch die Isotopenaustauschreaktion von  $^{14}\text{CO}_2$  in 2-Oxoglutarat in Gegenwart oder Abwesenheit von CoA (gemessen bei  $85^\circ\text{C}$ ). Da die Pyruvat:Akzeptor-Oxidoreduktase unter den gleichen Bedingungen eindeutig aktiv war (siehe 1.2.2.2), kann man davon ausgehen, dass die fehlende Aktivität der 2-Oxoglutarat:Akzeptor-Oxidoreduktase nicht auf einem experimentellen Fehler beruht, sondern tatsächlich auf die Abwesenheit dieses Enzyms zurückzuführen ist. Des Weiteren wurde keine Aktivität der ATP-Citrat-Lyase entdeckt ( $< 1 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ ).

#### 1.2.2.2. Mögliche $\text{CO}_2$ -Fixierungsenzyme in *I. hospitalis*

Die hier dargestellten Ergebnisse ließen die Vermutung zu, dass *I. hospitalis* keinen der bekannten  $\text{CO}_2$ -Fixierungswege verwendet. Jedoch wurden zwei  $\text{CO}_2$ -fixierende Enzymaktivitäten in Zellextrakten von *I. hospitalis* nachgewiesen.

Pyruvat:Akzeptor-Oxidoreduktase: Die Aktivität der Pyruvat:Akzeptor-Oxidoreduktase konnte sowohl im spektrophotometrischen Ansatz mit Methylviologen als Elektronenakzeptor ( $115 \pm 15 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$  bei  $75^\circ\text{C}$ ), als auch im radioaktiven Ansatz durch Austausch von  $^{14}\text{CO}_2$  in die Carboxylgruppe von Pyruvat ( $145 \pm 15 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$  bei  $85^\circ\text{C}$ ) nachgewiesen werden. Mit  $\text{NAD}^+$  oder  $\text{NADP}^+$  statt Methylviologen als Elektronenakzeptor wurde keine Aktivität gefunden ( $< 1 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$  bei  $75^\circ\text{C}$ ), was die Aktivität einer Pyruvat-Dehydrogenase ausschließt.

PEP-Carboxylase: Zellextrakte von *I. hospitalis* katalysierten die PEP und NADH abhängige Fixierung von  $^{14}\text{CO}_2$  in säurestabile Produkte mit einer spezifischen Aktivität von  $202 \pm 20 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ . Phosphat, GDP oder ADP stimulierten diese Aktivität nicht. Somit handelte es sich nicht um die Aktivitäten der PEP-Carboxytransphosphorylase (sie benötigt Phosphat als weiteres Substrat) oder der PEP-Carboxykinase (sie benötigt GDP oder ADP als weiteres Substrat). Die Ergebnisse lassen auf das Vorhandensein der PEP-Carboxylase schließen, die die Bildung von Oxalacetat aus PEP und  $\text{CO}_2$  katalysiert. Oxalacetat wurde in diesem Test in einer an die NADH-abhängige Malat-Dehydrogenase gekoppelten Reaktion zum säurestabilen Malat reduziert.

#### 1.2.2.3. Aktivitäten weiterer Enzyme des zentralen Kohlenstoffmetabolismus

Die Aktivität der Pyruvat:Akzeptor-Oxidoreduktase legt nahe, dass der erste  $\text{CO}_2$ -Fixierungsschritt in *I. hospitalis* die reduktive Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Pyruvat ist. Deswegen wurden weitere Enzymaktivitäten untersucht, die an möglichen Biosynthesewegen ausgehend von Pyruvat beteiligt sind. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Pyruvat:H<sub>2</sub>O-Dikinase: Die Bildung von PEP aus Pyruvat wurde getestet, indem diese Reaktion an die endogene PEP-Carboxylase und Malat-Dehydrogenase gekoppelt wurde. Damit wurde aus Pyruvat über PEP und Oxalacetat das säurestabile Malat gebildet (siehe 1.2.2.2). Zellextrakte von *I. hospitalis* fixierten <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in einer Pyruvat, Mg-ATP und NADH abhängigen Reaktion mit einer spezifischen Aktivität von  $210 \pm 10 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ . Zugewetztes Phosphat führte zu keiner Stimulation der Reaktion, was die Aktivität der Pyruvat:Phosphat-Dikinase ausschließt. Die Reaktion wurde außerdem nicht durch Avidin gehemmt, was die Bildung von Oxalacetat aus Pyruvat durch die Biotin-abhängige Pyruvat-Carboxylase ausschließt. Auch wurde keine Aktivität der Pyruvat-Kinase verzeichnet. Dies lässt darauf schließen, dass in *I. hospitalis* die Pyruvat:H<sub>2</sub>O-Dikinase aktiv ist.

PEP-Carboxylase: Wie in 1.2.2.2 beschrieben, kann in Zellextrakten von *I. hospitalis* über die PEP-Carboxylase PEP zu Oxalacetat mit einer spezifischen Aktivität von  $202 \pm 20 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$  carboxyliert werden.

Malat-Dehydrogenase: Zellextrakte von *I. hospitalis* wiesen hohe Aktivitäten der NAD(P)<sup>+</sup>-abhängigen Malat-Dehydrogenase auf. In Gegenwart von Oxalacetat wurde sowohl die Oxidation von NADPH ( $745 \pm 100 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ ), als auch die Oxidation von NADH ( $1190 \pm 240 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ ) bei 75 °C nachgewiesen.

Fumarase: Die Aktivität der Fumarase wurde bei 75 °C in Richtung der Hydratation von Fumarat zu Malat gemessen und betrug  $895 \pm 45 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ .

Fumarat-Reduktase: Die Aktivität der Fumarat-Reduktase wurde in Richtung der Fumarat-Reduktion zu Succinat mit reduziertem Methylviologen als artifiziellem Elektronendonator gemessen. Sie betrug  $840 \pm 45 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ .

Citrat-Synthase: Zellextrakte von *I. hospitalis* katalysierten die Bildung von Citrat aus Oxalacetat und Acetyl-CoA mit einer spezifischen Aktivität von  $21 \pm 4 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ . Es war keine Aktivität der ATP-Citrat-Lyase detektierbar. Außerdem benötigte die beobachtete Reaktion kein ADP oder Phosphat und wurde dadurch auch nicht stimuliert. Folglich ist diese Reaktion auf die Aktivität der Citrat-Synthase zurückzuführen.

Aconitase: Die Aktivität der Aconitase wurde in einem an die endogene Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase (siehe unten) gekoppelten Ansatz gemessen. Sie wurde durch Sauerstoff gehemmt und betrug im Anoxischen  $30 \pm 2 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ .

Isocitrat-Dehydrogenase: Zellextrakte katalysierten die NADP<sup>+</sup>-abhängige, oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu 2-Oxoglutarat mit einer spezifischen Aktivität von  $238 \pm 22 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ .

Wie in 1.2.2.1 erwähnt, wurde keine Aktivität der 2-Oxoglutarat: Akzeptor-Oxidoreduktase gefunden. Auch eine NAD(P)<sup>+</sup>-abhängige 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase war nicht aktiv. Des Weiteren fehlten die Aktivitäten einer L-Malyl-CoA-Lyase und einer Laktat-Dehydrogenase.

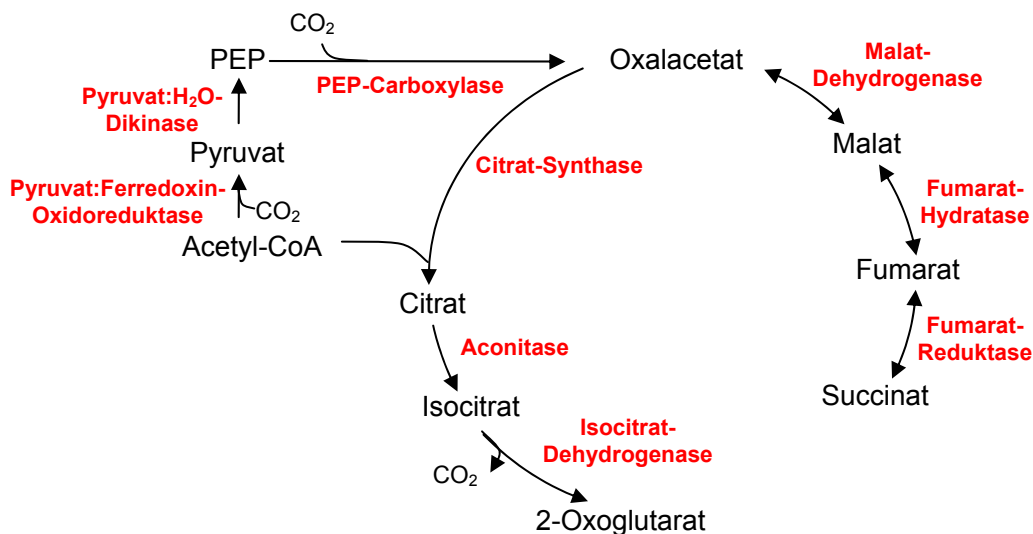
Tabelle 2: Spezifische Aktivitäten von Enzymen des zentralen Kohlenstoffmetabolismus in *I. hospitalis*-Zellextrakten.

### III. Ergebnisse

Enzyme	E.C.- Nummer	Inkubations- temperatur (°C)	spezifische Aktivität (nmol min <sup>-1</sup> (mg Protein) <sup>-1</sup> )
Citrat-Synthase	2.3.3.1 2.3.3.3	75	21 ± 4
ATP-Citrat-Lyase	2.3.3.8	75	< 1
Aconitase	4.2.1.3	75	31 ± 2
Isocitrat-Dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> )	1.1.1.42	75	240 ± 20
2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> , NAD <sup>+</sup> )	1.2.1.52	75	< 1
2-Oxoglutarat:Akzeptor-Oxidoreduktase: Methylviologen	1.2.7.3	75	< 1
<sup>14</sup> CO <sub>2</sub> -Austausch		85	< 1
Fumarat-Hydratase (Klasse I)	4.2.1.2	75	895 ± 45
Fumarat-Reduktase (Methylviologen)	1.3.99.1	75	840 ± 130
Malat-Dehydrogenase: NAD <sup>+</sup>	1.1.1.37	75	1190 ± 240
NAPD <sup>+</sup>	1.1.1.82	75	745 ± 100
Malyl-CoA-Lyase	4.1.3.24	75	< 1
Pyruvat-Dehydrogenase (NAD <sup>+</sup> , NADP <sup>+</sup> )	1.2.1.51	75	< 1
Pyruvat:Akzeptor-Oxidoreduktase: Methylviologen	1.2.7.1	75	115 ± 15
<sup>14</sup> CO <sub>2</sub> -Austausch		85	145 ± 15
Pyruvat-Carboxylase	6.4.1.1	85	< 1
Pyruvat-Kinase	2.7.1.40	85	< 1
Pyruvat:Phosphat-Dikinase	2.7.9.1	85	< 1
Pyruvat:H <sub>2</sub> O-Dikinase	2.7.9.2	85	210 ± 10
PEP-Carboxylase	4.1.1.31	85	202 ± 20
PEP-Carboxykinase	4.1.1.32	85	< 1
PEP-Carboxytransphosphorylase	4.1.1.38	85	< 1
Laktat-Dehydrogenase (L-LDH, NAD <sup>+</sup> )	1.1.1.27	75	< 1
Laktat-Dehydrogenase (D-LDH, NAD <sup>+</sup> )	1.1.1.28		

#### 1.2.2.4. Biosynthetisches Potential, abgeleitet von den Enzymaktivitäten

Anhand der detektierten enzymatischen Reaktionen in Zellextrakten von *I. hospitalis* kann folgendes Schema der CO<sub>2</sub>-Fixierungsreaktionen und weiterer Biosynthesewege des zentralen Kohlenstoffmetabolismus erstellt werden (Abb. 4): Die CO<sub>2</sub>-Fixierung in *I. hospitalis* könnte über einen bisher unbekannten Weg, ausgehend von Acetyl-CoA, verlaufen. Acetyl-CoA kann über zwei CO<sub>2</sub>-Fixierungsschritte in Oxalacetat überführt werden. Ein unvollständiger Citratzyklus ermöglicht die Synthese von Succinat über Malat und Fumarat, sowie die Synthese von 2-Oxoglutarat über Citrat und Isocitrat. Es wurden keine Hinweise darauf erhalten, auf welche Weise die Regeneration des mutmaßlichen primären Akzeptors Acetyl-CoA erfolgen könnte.



**Abb. 4:** Biosynthetisches Potential für CO<sub>2</sub>-Fixierung und zentralen Kohlenstoffmetabolismus, entsprechend den Enzymaktivitäten in Zellextrakten von *I. hospitalis*.

### 1.2.3. Genomanalyse

#### 1.2.3.1. Gene für Enzyme des zentralen Kohlenstoffmetabolismus

Bekannte CO<sub>2</sub>-Fixierungswege: Gene für die Schlüsselenzyme der bekannten CO<sub>2</sub>-Fixierungswege wurden nicht gefunden. Dazu zählten Gene für die Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Typ I, II, oder III) oder für ein "RubisCo-like" Protein (Calvin-Zyklus), Gene für die Schlüsselenzyme des reduktiven Acetyl-CoA-Wegs (Kohlenmonoxid-Dehydrogenase, Formiat-Dehydrogenase) oder des 3-Hydroxypropionat-Zyklus (Acetyl-CoA/Propionyl-CoA-Carboxylase, Malonyl-CoA-Reduktase und Propionyl-CoA-Synthase), sowie das Gen für eine ATP-Citrat-Lyase, ein Schlüsselenzym des reduktiven Citrat-Zyklus.

CO<sub>2</sub>-Fixierungsschritte: Es wurden zwei Gencluster gefunden (Gene 1217-1220 und 1036-1039 der Annotation des DOE Joint Genome Institutes (JGI)), die beide für die vier Untereinheiten einer 2-Oxoacid:Ferredoxin-Oxidoreduktase kodieren könnten. Die Spezifität

einer 2-Oxoacid:Ferredoxin-Oxidoreduktase für Pyruvat oder 2-Oxoglutarat kann nicht aus der Gensequenz, sondern nur über enzymatische Tests mit dem entsprechenden Substrat bestimmt werden. In Enzymtests mit Zellextrakten von *I. hospitalis* wurde die Aktivität der Pyruvat:Akzeptor-Oxidoreduktase nachgewiesen, wohingegen keine Aktivität der 2-Oxoglutarat-Akzeptor-Oxidoreduktase detektiert wurde. Somit handelt es sich bei einer der beiden kodierten 2-Oxoacid:Ferredoxin-Oxidoreduktasen wahrscheinlich um eine Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, die die Ferredoxin-abhängige, reduktive Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Pyruvat katalysiert. Gene für die NAD(P)<sup>+</sup>-abhängige Pyruvat-Dehydrogenase wurden nicht gefunden.

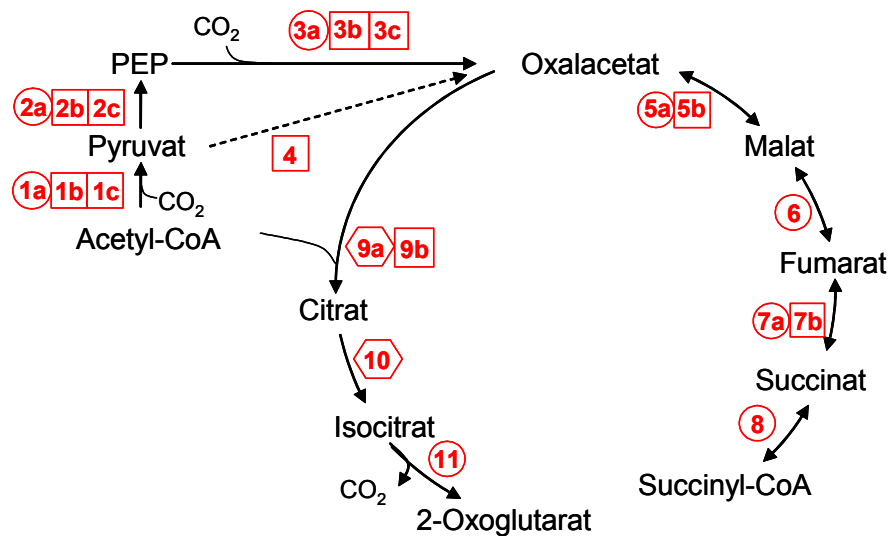
Es wurde ein Gen annotiert, das für eine Pyruvat:H<sub>2</sub>O-Dikinase (Synthese von PEP aus Pyruvat) kodieren könnte (Gen 1075). Die entsprechenden Gene für die Pyruvat:Phosphat-Dikinase oder die Pyruvat-Kinase wurden nicht entdeckt.

Ein Gen für die PEP-Carboxylase wurde nicht von JGI detektiert, es konnte jedoch durch nachträgliche Blast-Analysen im Genom von *I. hospitalis* annotiert werden (Gen 334). Es handelt sich dabei um die archaeenspezifische PEP-Carboxylase (Patel et al., 2004). Gene für alternative Enzyme zur Synthese von Oxalacetat aus Pyruvat oder PEP (Pyruvat-Carboxylase, PEP-Carboxykinase oder PEP-Carboxytransphosphorylase) wurden nicht gefunden.

Citrat-Zyklus: Im Genom von *I. hospitalis* sind fast alle mutmaßlichen Gene für die Enzyme des Citrat-Zyklus vorhanden. Dazu gehören eine Isocitrat-Dehydrogenase (Gen 1027), eine Fumarat Hydratase (Klasse 1, Gen 658) eine Malat-Dehydrogenase (Gen 1223) und eine Succinat-Dehydrogenase (Gene 270, 409, 43, 1333). Gene für eine Fumarat-Reduktase wurden nicht gefunden. Jedoch kann nicht unterschieden werden, ob die vom Zellextrakt von *I. hospitalis* katalysierte Fumarat-Reduktion von der annotierten Succinat-Dehydrogenase oder einer separaten, bislang nicht annotierten Fumarat-Reduktase ausgeführt wurde. Ein Gen für eine Aconitase konnte bisher nicht annotiert werden. Die Aktivität dieses Enzyms wurde in *I. hospitalis*-Zellextrakten aber eindeutig nachgewiesen, ein entsprechendes Gen muss also vorhanden sein. Ähnlich verhält es sich mit der Citrat-Synthase. Ein Gen für eine (si)-spezifische Citrat-Synthase wurde nicht im Genom gefunden. Die Blastsequenzen für die (si)-spezifische Citrat-Synthase waren von *Thermus aquaticus*, *Pyrococcus furiosus* und *Escherichia coli*, allerdings waren die e-values alle größer als  $e^{-5}$ , und somit war keine signifikante Sequenzähnlichkeit vorhanden. Da in Zellextrakten von *I. hospitalis* die Aktivität der Citrat-Synthase nachgewiesen wurde, muss im Genom ein bisher unbekanntes Gen vorhanden sein. Am Lehrstuhl für Mikrobiologie in Freiburg wurde ein Gen entdeckt, dass für eine (re)-spezifische Citrat-Synthase kodieren könnte. Dieses Gen wird dort nach Klonierung und Expression in *E. coli* auf seine Funktion hin überprüft. Mögliche Gene für eine NAD(P)<sup>+</sup>-abhängige 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase, eine Isocitrat-Lyase, eine L-Malyl-CoA-Lyase, eine ATP-Citrat-Lyase, eine Citrat-Lyase und ein Malat-Enzym wurden nicht entdeckt.

### 1.2.3.2. Biosynthetisches Potential, abgeleitet von den Genomdaten

Die Ergebnisse der Genomanalyse bestätigten weitgehend die Ergebnisse aus den enzymatischen Analysen: Von Enzymen, die nicht aktiv waren, wurden auch die entsprechenden Gene nicht gefunden. Hingegen wiesen fast alle Enzyme, die in *I. hospitalis*-Zellextrakten aktiv waren, ein entsprechendes Gen auf. Ausnahmen stellen die Aconitase und die Citrat-Synthase dar, deren entsprechende Gene noch nicht identifiziert werden konnten, sowie die Gene für die 2-Oxoacid:Ferredoxin-Oxidoreduktase, deren Spezifität für Pyruvat oder 2-Oxoglutarat durch die Gensequenz alleine nicht bestimmt werden kann (1.2.3.1). In Abb. 5 wird das biosynthetische Potential, das sich aus den Genomdaten im Einklang mit den Enzymaktivitäten ergibt, dargestellt. Acetyl-CoA kann von der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase reduktiv zu Pyruvat carboxyliert werden. Dieses kann darauf über die Pyruvat:H<sub>2</sub>O-Dikinase zu PEP umgewandelt werden. Aus PEP kann über die PEP-Carboxylase Oxalacetat gebildet werden. Oxalacetat mündet in einen unvollständigen Citrat-Zyklus. Fast alle Gene für die in *I. hospitalis* aktiven Enzyme des Citrat-Zyklus waren im Genom annotiert.



**Abb. 5:** Biosynthetisches Potential für CO<sub>2</sub>-Fixierung und zentralen Kohlenstoffmetabolismus, entsprechend den Genomdaten von *I. hospitalis*.

Die Kreise kennzeichnen mutmaßliche Gene, die im Genom entdeckt wurden (e-value < e<sup>-11</sup>). Die entsprechenden Enzymaktivitäten wurden in Zellextrakten von *I. hospitalis* nachgewiesen (1.2.2). Die Quadrate kennzeichnen Gene, die nicht im Genom von *I. hospitalis* gefunden wurden. Aktivitäten der entsprechenden Enzyme fehlten auch in Zellextrakten von *I. hospitalis* (1.2.2). Die Sechsecke kennzeichnen Enzyme deren Aktivitäten in Zellextrakten von *I. hospitalis* nachgewiesen wurden, deren Gene bis jetzt jedoch noch nicht im Genom annotiert werden konnten.

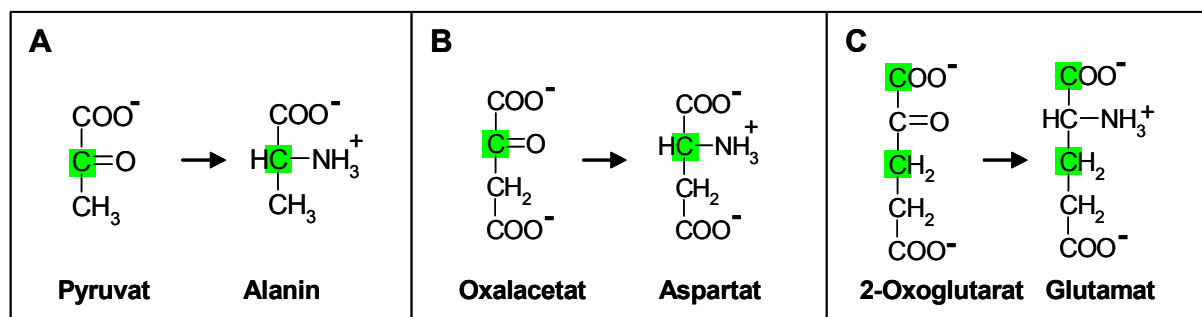
1a: 2-Oxoacid:Ferredoxin-Oxidoreduktase, 1b: Acetyl-CoA-Carboxylase, 1c: Pyruvat-Dehydrogenase, 2a: Pyruvat:H<sub>2</sub>O-Dikinase, 2b: Pyruvat:Phosphat-Dikinase, 2c: Pyruvat-Kinase, 3a: PEP-Carboxylase, 3b: PEP-Carboxykinase, 3c: PEP-Carboxytransphosphorylase, 4: Pyruvat-Carboxylase, 5a: Malat-Dehydrogenase, 5b: Malat-Quinon-Oxidoreduktase, 6: Fumarat-Hydratase, 7a: Succinat-Dehydrogenase, 7b: Fumarat-Reduktase, 8: Succinat:CoA-Ligase (ADP bildend), 9a: Citrat-Synthase, 9b: ATP-Citrat-Lyase, 10: Aconitase, 11: Isocitrat-Dehydrogenase.



### 1.2.4. Retrobiosynthetische Analyse der $^{13}\text{C}$ -markierten Aminosäuren

#### 1.2.4.1. Abgeleitete $^{13}\text{C}$ -Markierung von zentralen Metaboliten

*I. hospitalis* wurde auf  $[1-^{13}\text{C}]$ Acetat kultiviert. Dieses wurde in den Zellkohlenstoff inkorporiert, und somit auch in die Aminosäuren. Mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie wurde die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den einzelnen Kohlenstoffpositionen der verschiedenen Aminosäuren bestimmt. Durch retrobiosynthetische Analysen wurde darauf die  $^{13}\text{C}$ -Markierung in den Vorstufen der analysierten Aminosäuren ermittelt. Dies ist möglich, da die Biosynthese von Aminosäuren bis auf wenige Ausnahmen in allen Organismen über die gleichen, bekannten Wege erfolgt. Das Prinzip wird in Abb. 6 beispielhaft für die Aminosäuren Alanin, Aspartat und Glutamat erklärt. Alanin wird durch eine Transaminierungsreaktion aus Pyruvat synthetisiert. Eine  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung an der Kohlenstoffposition C2 des Alanins bedeutet somit, dass die Vorstufe Pyruvat ebenfalls eine  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung an der Position C2 aufwies. Auf ähnliche Weise erfolgt die Biosynthese von Aspartat über eine Transaminierungsreaktion aus Oxalacetat und die Biosynthese von Glutamat über eine Transaminierungsreaktion aus 2-Oxoglutarat. Eine  $^{13}\text{C}$ -Markierung an C2 des Aspartats besagt folglich, dass die Vorstufe Oxalacetat an C2  $^{13}\text{C}$ -markiert war, und eine  $^{13}\text{C}$ -Markierung an C1 und C3 des Glutamats weist auf eine  $^{13}\text{C}$ -Markierung an C1 und C3 der Vorstufe 2-Oxoglutarat hin.



**Abb. 6:** Biosynthese von A: Alanin aus Pyruvat, B: Aspartat aus Oxalacetat, C: Glutamat aus 2-Oxoglutarat. Die grün hinterlegten Kohlenstoffatome stellen beispielhaft  $^{13}\text{C}$ -Markierungen der Aminosäuren und ihrer Vorstufen dar, die auch in *I. hospitalis* detektiert wurden.

Die Synthese der anderen Aminosäuren erfolgt über hier nicht gezeigte, komplexere Biosynthesewege. Durch Zurückverfolgung dieser Wege kann auch die  $^{13}\text{C}$ -Markierung ihrer Vorstufen bestimmt werden. Für alle aus *I. hospitalis* aufgereinigten Aminosäuren wurden die  $^{13}\text{C}$ -Markierungsmuster der Vorstufen auf diese Weise ermittelt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tab. 3 dargestellt.

### III. Ergebnisse

Tabelle 3:  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den einzelnen Kohlenstoffpositionen der Aminosäuren von *I. hospitalis* nach Kultivierung mit 0,5 mM  $[1-^{13}\text{C}]\text{Acetat}$ . Ebenfalls angegeben sind die äquivalenten Kohlenstoffpositionen in Molekülen des zentralen Kohlenstoffmetabolismus. Diese wurden auf der Basis metabolischer Netzwerke erstellt.  
n.d: nicht detektiert

Aminosäure	Position	Chemical shift [ppm]	Rel. $^{13}\text{C}$ [%]	Entsprechende Position in metabolischen Vorstufen
Alanin	1	171,0	n.d.	1 (Pyruvat), $\text{CO}_2$
	2	50,7	16,8	2 (Pyruvat), 1 (Acetyl-CoA)
	3	17,8	3,3	3 (Pyruvat), 2 (Acetyl-CoA)
Serin	1	173,6	n.d.	1 (PEP)
	2	53,3	15,3	2 (PEP)
	3	57,9	3,3	3 (PEP)
Aspartat	1	180,7	1,1	1 (Oxalacetat), 1 (Pyruvat), $\text{CO}_2$
	2	54,4	14,5	2 (Oxalacetat), 2 (Pyruvat), 1 (Acetyl-CoA)
	3	43,7	4,6	3 (Oxalacetat), 3 (Pyruvat), 2 (Acetyl-CoA)
	4	182,8	1,1	4 (Oxalacetat), $\text{CO}_2$
Threonin	1	n.d.	n.d.	1 (Oxalacetat), 1 (Pyruvat), $\text{CO}_2$
	2	56,9	14,0	2 (Oxalacetat), 2 (Pyruvat), 1 (Acetyl-CoA)
	3	63,9	3,3	3 (Oxalacetat), 3 (Pyruvat), 2 (Acetyl-CoA)
	4	14,2	1,1	4 (Oxalacetat), $\text{CO}_2$
Isoleucin	1	171,6	18,1	1 (Acetyl-CoA)
	2	57,6	2,2	2 (Acetyl-CoA)
	3	39,1	14,9	2 (Pyruvat), 1 (Acetyl-CoA)
	4	24,9	6,2	2 (Pyruvat), 1 (Acetyl-CoA)
	5	11,4	1,1	3 (Pyruvat), 2 (Acetyl-CoA)
	6	14,5	1,3	3 (Pyruvat), 2 (Acetyl-CoA)
Glutamat	1	183,3	20,0	1 (2-Oxoglutarat), 1 (Acetyl-CoA)
	2	56,3	5,3	2 (2-Oxoglutarat), 2 (Acetyl-CoA)
	3	32,2	16,9	3 (2-Oxoglutarat), 2 (Oxalacetat), 2 (Pyruvat), 1 (Acetyl-CoA)
	4	34,5	5,7	4 (2-Oxoglutarat), 3 (Oxalacetat), 3 (Pyruvat), 2 (Acetyl-CoA)
	5	183,5	1,1	5 (2-Oxoglutarat), 4 (Oxalacetat), $\text{CO}_2$
Prolin	1	171,6	19,7	1 (2-Oxoglutarat), 1 (Acetyl-CoA)
	2	59,5	4,0	2 (2-Oxoglutarat), 2 (Acetyl-CoA)
	3	28,3	12,9	3 (2-Oxoglutarat), 2 (Oxalacetat), 2 (Pyruvat), 1 (Acetyl-CoA)
	4	23,5	4,1	4 (2-Oxoglutarat), 3 (Oxalacetat), 3 (Pyruvat), 2 (Acetyl-CoA)
	5	46,5	1,1	5 (2-Oxoglutarat), 4 (Oxalacetat), $\text{CO}_2$
Arginin	1	170,0	11,0	1 (2-Oxoglutarat), 1 (Acetyl-CoA)
	2	50,8	6,7	2 (2-Oxoglutarat), 2 (Acetyl-CoA)
	3	25,3	14,5	3 (2-Oxoglutarat), 2 (Oxalacetat), 2 (Pyruvat), 1 (Acetyl-CoA)
	4	22,2	5,2	4 (2-Oxoglutarat), 3 (Oxalacetat), 3 (Pyruvat), 2 (Acetyl-CoA)
	5	38,8	1,1	5 (2-Oxoglutarat), 4 (Oxalacetat), $\text{CO}_2$
	6	164,1	3,1	
Lysin	1	171,9	22,6	1 (Acetyl-CoA)
	2	51,5	7,6	2 (Acetyl-CoA)
	3	27,0	6,9	2 (2-Oxoglutarat), 2 (Acetyl-CoA)
	4	18,7	26,3	3 (2-Oxoglutarat), 2 (Oxalacetat), 2 (Pyruvat), 1 (Acetyl-CoA)
	5	23,5	7,7	4 (2-Oxoglutarat), 3 (Oxalacetat), 3 (Pyruvat), 2 (Acetyl-CoA)
	6	36,2	1,1	5 (2-Oxoglutarat), 4 (Oxalacetat), $\text{CO}_2$

Tab. 3 zeigt, dass bis zu 20 % der Kohlenstoffeinheiten der Aminosäuren aus dem exogen zugeführten Acetat stammten. Der Rest wurde durch CO<sub>2</sub>-Fixierung erhalten. In der gleichen Tabelle werden für jede Kohlenstoffposition der Aminosäuren die entsprechenden Kohlenstoffpositionen ihrer metabolischen Vorstufen angegeben. Daraus kann die <sup>13</sup>C-Anreicherung in den Kohlenstoffpositionen der Vorstufen ermittelt werden. Die ermittelten <sup>13</sup>C-Anreicherungen in den C-Atomen der Vorstufen stimmten bei allen Aminosäuren überein. Dadurch wird eine mehrfach abgesicherte Aussage über die Markierung der Vorstufen ermöglicht.

Aus den Werten von Tab. 3 wurden die durchschnittlichen <sup>13</sup>C-Anreicherungen der einzelnen Kohlenstoffatome von Acetyl-CoA, Pyruvat, Oxalacetat und 2-Oxoglutarat errechnet. Die Ergebnisse werden in Tab. 4 gezeigt.

Tabelle 4: Abgeleitete <sup>13</sup>C-Markierungen von zentralen Intermediaten des Kohlenstoffmetabolismus von *I. hospitalis* nach dessen Kultivierung mit 0,5 mM [1-<sup>13</sup>C]Acetat. Kohlenstoffpositionen mit hoher <sup>13</sup>C-Anreicherung (aus dem <sup>13</sup>C-markierten C1-Atom des zugegebenen Acetats) sind rot markiert.

Metabolit	Position	% <sup>13</sup> C	Rekonstruiert und gemittelt aus
Acetyl-CoA	1	16,3 ± 4,9	ala, asp, thr, ile, glu, pro, arg, lys
	2	4,6 ± 2,1	ala, asp, thr, ile, glu, pro, arg, lys
Pyruvat	1	1,1	asp
	2	15,2 ± 5,2	ala, asp, thr, ile, glu, pro, arg, lys
	3	4,0 ± 2,1	ala, asp, thr, ile, glu, pro, arg, lys
Oxalacetat	1	1,1	asp
	2	16,5 ± 4,9	asp, thr, ile, glu, pro, arg, lys
	3	5,1 ± 1,5	asp, thr, ile, glu, pro, arg, lys
	4	1,1 ± 0	asp, thr, ile, glu, pro, arg, lys
2-Oxoglutarat	1	16,9 ± 5,1	glu, pro, arg
	2	5,7 ± 1,3	glu, pro, arg, lys
	3	17,6 ± 5,9	glu, pro, arg, lys
	4	5,7 ± 1,5	glu, pro, arg, lys
	5	1,1 ± 0	glu, pro, arg, lys

Die erhaltenen <sup>13</sup>C-Markierungen der zentralen Intermediate des Kohlenstoffmetabolismus ermöglichen Vorhersagen über die metabolischen Netzwerke, die zu ihrer Biosynthese führten.

#### 1.2.4.2. Biosynthetisches Potential, abgeleitet von den $^{13}\text{C}$ -Markierungen

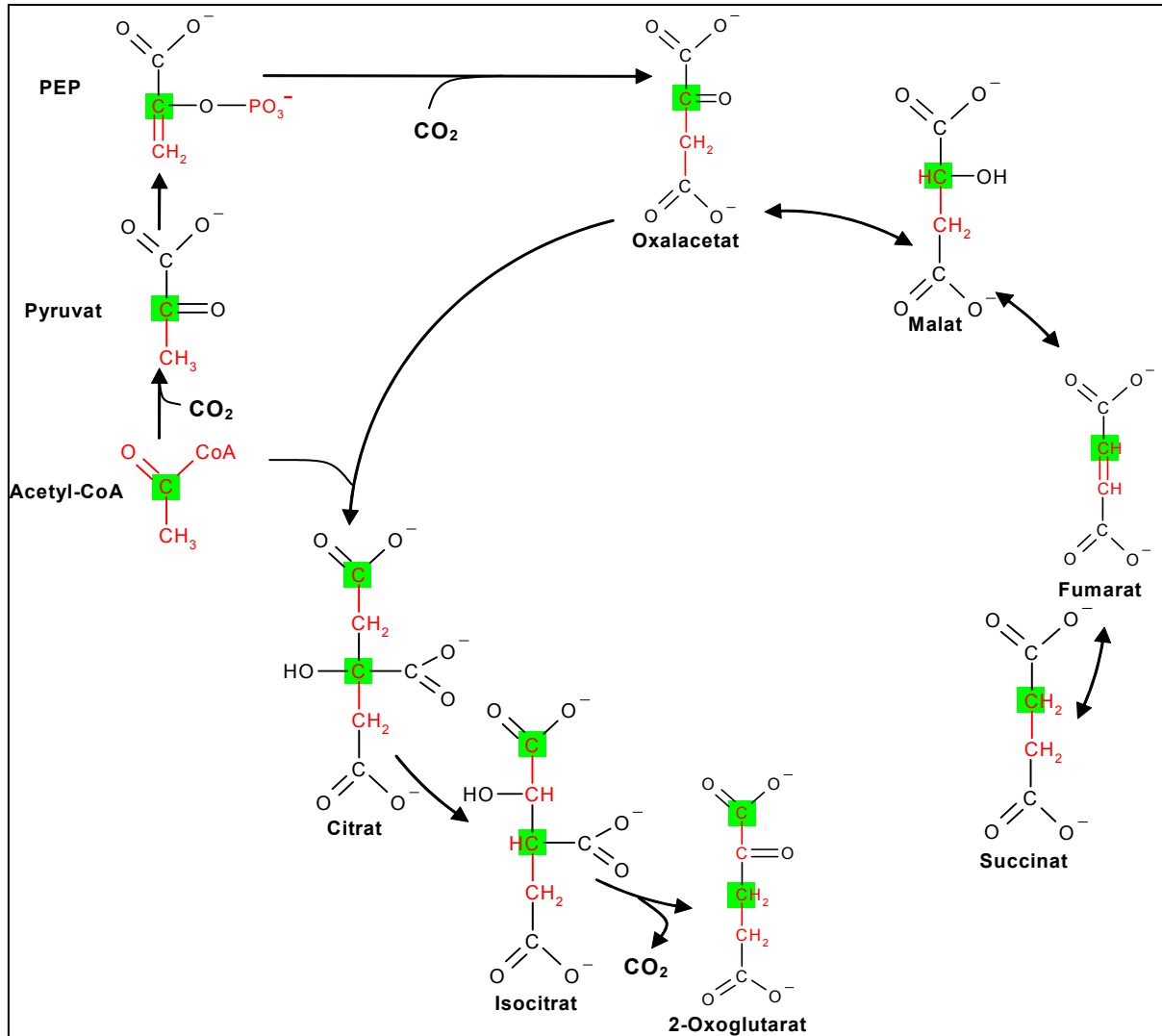
Das metabolische Netzwerk, das zu den ermittelten  $^{13}\text{C}$ -Markierungen der Intermediate AcetylCoA, Pyruvat, Oxalacetat und 2-Oxoglutarat führt, ist in Abb. 7 dargestellt.

Der primäre  $\text{CO}_2$ -Akzeptor in *I. hospitalis* ist demnach Acetyl-CoA. Die dominante Markierung von Acetyl-CoA an C1 ( $16,3 \pm 4,9 \text{ \% } ^{13}\text{C}$ ) reflektiert die Markierung des zugegebenen Substrates [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]Acetat.

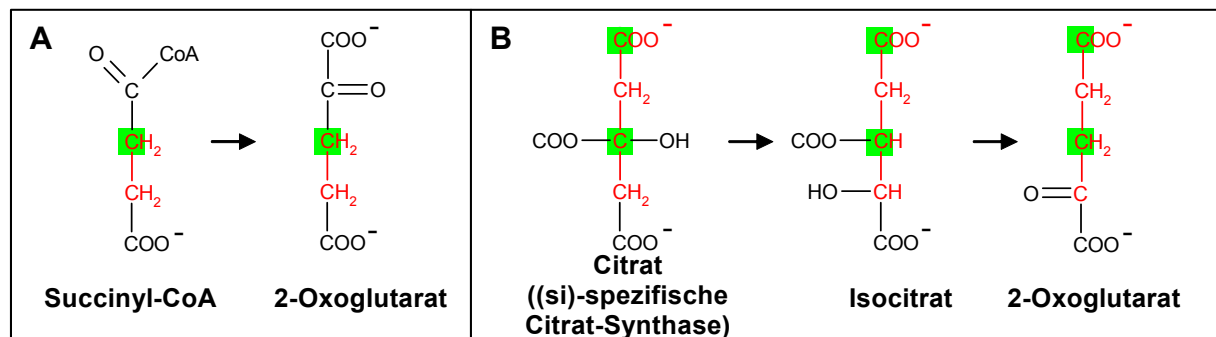
Die dominante  $^{13}\text{C}$ -Markierung von Pyruvat an Position C2 ( $15,2 \pm 5,2 \text{ \% } ^{13}\text{C}$ ) weist darauf hin, dass Pyruvat ein Produkt der Carboxylierung von Acetyl-CoA ist.

Oxalacetat zeigt eine starke  $^{13}\text{C}$ -Markierung ( $16,5 \pm 4,9 \text{ \% } ^{13}\text{C}$ ) an C2. Dies kann mit der Synthese aus Pyruvat (bzw. über die Carboxylierung von PEP) erklärt werden. Das Auftreten einer schwachen Markierung ( $5,1 \pm 1,5 \text{ \% } ^{13}\text{C}$ ) an C3 von Oxalacetat ist wahrscheinlich ein Resultat der reversiblen Hin- und Rückreaktionen von Oxalacetat zum symmetrischen Fumarat oder Succinat.

2-Oxoglutarat zeigt dominante  $^{13}\text{C}$ -Markierungen an C1 und C3 ( $16,9 \pm 5,1$  bzw.  $17,6 \pm 5,9 \text{ \% } ^{13}\text{C}$ ). Die reduktive Carboxylierung von Succinyl-CoA zu 2-Oxoglutarat über die 2-Oxoglutarat:Ferredoxin-Oxidoreduktase kann folglich ausgeschlossen werden. Aufgrund der Symmetrie von Succinat würde die Verknüpfung des Succinats mit CoA, und somit die Carboxylierung, am C1- oder am C4-Atom erfolgen. Dies hätte eine  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung an C3 oder C4 zur Folge. In keinem Fall dürfte eine Markierung an C1 auftreten, da dieses aus unmarkiertem  $\text{CO}_2$  stammen würde (Abb. 8 A). Bei den NMR-Analysen von Glutamat, Prolin und Arginin tritt jedoch eine hohe  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung an der entsprechenden Position auf (siehe Tab. 3). Die  $^{13}\text{C}$ -Markierung von 2-Oxoglutarat an C1 und C3 kann nur durch die Synthese über Citrat und Isocitrat unter Beteiligung einer (re)-spezifischen Citrat-Synthase erklärt werden. Citrat ist zwar ein symmetrisches Molekül, wird aber asymmetrisch synthetisiert und abgebaut. Die Stereochemie des synthetisierten Citrats bzw. die Anordnung der Hydroxygruppe am C-Atom C3 nach der Verknüpfung hat Auswirkungen auf die Richtung der Verschiebung der Hydroxygruppe bei der Synthese des Isocitrats. In dem hier gezeigten Fall wird die Hydroxygruppe mit dem C2-Atom des zuvor ankondensierten Acetats verknüpft, womit sich auch die Oxogruppe des 2-Oxoglutarats an dieser Position befindet (siehe Abb. 7). Eine (si)-spezifische Citrat-Synthase hätte eine Verschiebung der Hydroxygruppe zum C3-Atom des zuvor ankondensierten Oxalacetats zur Folge. Dies würde in der Bildung von C3- und C5-markiertem 2-Oxoglutarat resultieren (Abb. 8 B).



**Abb. 7:** Biosynthetisches Potential für CO<sub>2</sub>-Fixierung und zentralen Kohlenstoffmetabolismus, entsprechend den <sup>13</sup>C-Markierungen zentraler Metaboliten von *I. hospitalis*. Der Bereich der Metaboliten, der aus dem Acetatmolekül entstanden ist, ist durch rote Schrift gekennzeichnet. Die <sup>13</sup>C-markierten Kohlenstoffatome sind grün hinterlegt.



**Abb. 8 A,B:** Alternative Wege, die zur Biosynthese von 2-Oxoglutarat führen könnten.

**A:** Biosynthese über die 2-Oxoglutarat:Ferredoxin-Oxidoreduktase. Aufgrund der Symmetrie von Succinat könnte dieses an C1 oder C4 carboxyliert werden, was zu einer <sup>13</sup>C-Markierung an C3 oder C4 von 2-Oxoglutarat führen würde. In dieser Abbildung wird die Carboxylierung an C1 dargestellt.

**B:** Biosynthese über eine (si)-spezifische Citrat-Synthase. Dieses Enzym würde zu einer <sup>13</sup>C-Markierung an C3 und C5 des 2-Oxoglutarats führen.

Der Bereich der Metaboliten, der aus dem Acetatmolekül entstanden wäre, ist durch rote Schrift gekennzeichnet. Die <sup>13</sup>C-markierten Kohlenstoffatome sind grün hinterlegt.

### 1.3. Kohlenhydratstoffwechsel

Kohlenhydrate erfüllen vielfältige Funktionen in Zellen. Kohlenhydrate sind essentielle Bestandteile der Biosynthese von Nukleinsäuren und der Aminosäure Histidin. Sie werden außerdem für Glycosylierungen von Proteinen oder Lipiden benötigt. In vielen Organismen dient der Abbau von Glucose als Energie- und Kohlenstoffquelle. Auch als Speicherstoffe finden sie bei vielen Organismen Verwendung. Aufgrund der großen Bedeutung von Kohlenhydraten für die Zelle wurde der Kohlenhydratstoffwechsel in *I. hospitalis* analysiert.

#### 1.3.1. Biosynthese von Kohlenhydraten

##### 1.3.1.1. Enzymaktivitäten in Zellextrakten von *I. hospitalis*-Zellen

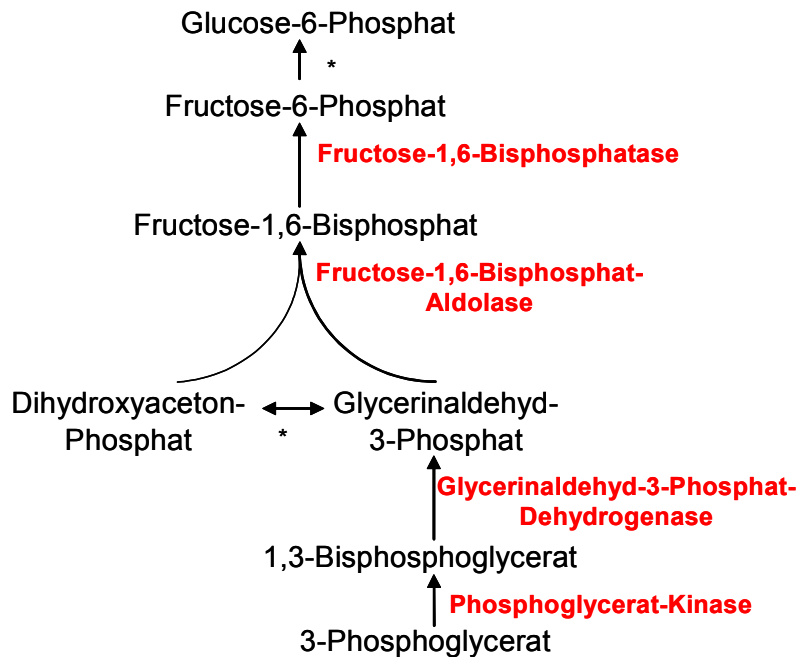
In Zellextrakten von *I. hospitalis* wurde nach Aktivitäten charakteristischer Enzyme der Gluconeogenese in anabolischer Richtung gesucht. Zur Synthese von PEP aus Pyruvat kann die in 1.2 nachgewiesene Pyruvat:H<sub>2</sub>O-Dikinase ( $210 \pm 10 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ ) verwendet werden.

Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und 3-Phosphoglycerat-Kinase: Diese beiden Enzyme wurden in einem gekoppelten Ansatz, ausgehend vom 3-Phosphoglycerat, bei 85 °C gemessen. Eine deutliche Reaktion fand nur in Gegenwart von ATP statt. Dies lässt darauf schließen, dass in *I. hospitalis* die für die archaeele Gluconeogenese typische phosphorylierende Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase aktiv ist, deren Substrat 1,3-Bisphosphoglycerat ist. Dieses Substrat wird von der Phosphoglycerat-Kinase durch die ATP-abhängige Phosphorylierung von 3-Phosphoglycerat bereitgestellt. Die spezifische Aktivität der Enzymreaktionen betrug in Gegenwart von NADPH  $270 \pm 10 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ . In Gegenwart von NADH betrug sie  $125 \pm 15 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ . Dies kann auf eine Bevorzugung von NADPH durch die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase zurückgeführt werden.

Fructose-1,6-Bisphosphatase: Die bei 85 °C gemessene Aktivität der Fructose-1,6-Bisphosphatase in Zellextrakten von *I. hospitalis* betrug  $146 \pm 4 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ .

Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase: Die Aktivität der Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase wurde in einem an die Aktivität der Fructose-1,6-Bisphosphatase gekoppelten Ansatz bei 85 °C bestimmt und betrug  $116 \pm 16 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ .

Abb. 9 stellt das aus diesen Ergebnissen abgeleitete biosynthetische Potential graphisch dar. *I. hospitalis* scheint demnach zur Gluconeogenese über den rückwärts gerichteten Embden-Meyerhoff-Weg fähig zu sein.



**Abb. 9:** Biosynthetisches Potential für die Gluconeogenese, entsprechend den Enzymaktivitäten in Zellextrakten von *I. hospitalis*.

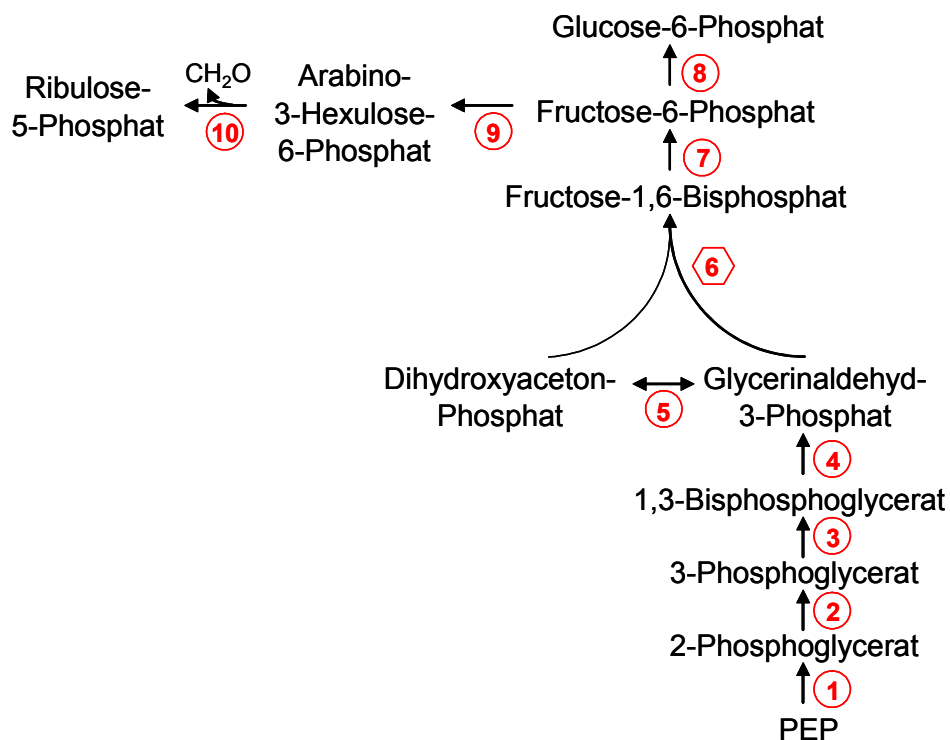
\*: nicht untersuchte Reaktionen

### 1.3.1.2. Genomanalyse

Im Genom von *I. hospitalis* wurden fast alle Gene, die *I. hospitalis* zur Gluconeogenese über den rückwärts gerichteten Embden-Meyerhoff-Weg befähigen könnten, gefunden:

Vom DOE Joint Genome Institute (JGI) wurden Gene annotiert, die für die Enolase (Gen 973), Phosphoglycerat-Mutase (Gen 1337), Phosphoglycerat-Kinase (Gen 268), phosphorylierende Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Gen 966) und Triosephosphat-Isomerase (Gen 675) kodieren könnten. Ein Gen für die Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase wurde nicht von JGI entdeckt. An der Universität Freiburg wurde jedoch im Genom ein Gen gefunden, das möglicherweise für eine untypische Form einer Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase kodiert; dieses Gen ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Ein mutmaßliches Gen für eine Fructose-1,6-Bisphosphatase wurde von JGI ebenfalls nicht annotiert, konnte aber durch Blast-Analysen eindeutig im Genom nachgewiesen werden (Gen 353). Es handelt sich dabei um die archaeenspezifische Klasse V Fructose-1,6-Bisphosphatase (Rashid et al., 2002; Nishimasu et al., 2004). Ein Gen für eine klassische Hexosephosphat-Isomerase fehlte im Genom. Jedoch wurde ein Gen gefunden, das für eine 1-Phosphoglucose-Isomerase der Cupin-Superfamilie kodieren könnte (Gen 404). Dieses Gen wies allerdings nur einen geringen e-value ( $e^{-11}$ ) zum korrespondierenden Gen aus *Thermococcus litoralis* auf. Das Genprodukt des 1-Phosphoglucose-Isomerase-Gens aus *Thermococcus litoralis* soll als Hexosephosphat-Isomerase fungieren (Hansen et al., 2001, 2005; Verhees et al., 2001).

Im Genom von *I. hospitalis* wurden zusätzlich Hinweise auf bekannte Pentosephosphat-Biosynthesewege entdeckt. Die eben erwähnte Fructose-1,6-Bisphosphatase ist ein Enzym des oxidativen Pentosephosphat-Wegs. Jedoch fehlten die charakteristischen Enzyme dieses Wegs, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconolacton-Hydrolase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase. Andererseits wurden Gene gefunden, die für die zwei charakteristischen Enzyme des kürzlich publizierten Ribulose-Monophosphat-Wegs (Goenrich et al., 2005, Soderberg et al., 2005, Kato et al., 2006) kodieren könnten. Dabei handelt es sich um die 3-Hexulose-6-Phosphat-Isomerase (Gen 764) und die Hexulose-6-Phosphat-Synthase (Gen 263).



**Abb. 10:** Biosynthetisches Potential für die Synthese von Kohlenhydraten, entsprechend den Genomdaten von *I. hospitalis*.

Die Kreise kennzeichnen mutmaßliche Gene, die im Genom annotiert wurden (e-value <  $e^{-11}$ ). Das Sechseck kennzeichnet die Fructose-1-Bisphosphat-Aldolase. Deren Aktivität wurde in Zellextrakten von *I. hospitalis* nachgewiesen, ein entsprechendes Gen konnte bisher jedoch noch nicht gefunden werden.

1: Enolase, 2: Phosphoglycerat-Mutase, 3: Phosphoglycerat-Kinase, 4: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 5: Triosephosphat-Isomerase, 6: Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase, 7: Fructose-1,6-Bisphosphatase, 8: Phosphogluco-Isomerase (Cupin-Typ), 9: 3-Hexulose-6-Phosphat-Isomerase, 10: 3-Hexulose-6-Phosphat-Synthase.

Anhand der im Genom gefundenen Gene lässt sich das in Abb. 10 dargestellte Schema des biosynthetischen Potentials zur Gluconeogenese und Pentosephosphat-Biosynthese von *I. hospitalis* erstellen. Die Gluconeogenese aus PEP über Fructose-1,6-Bisphosphat und Fructose-6-Phosphat könnte über einen (modifizierten) rückwärts gerichteten Embden-Meyerhoff-Weg verlaufen. Zur Biosynthese von Pentosephosphaten könnte der Ribulose-Monophosphat-Weg genutzt werden.



### 1.3.1.3. Retrobiosynthetische Analyse des $^{13}\text{C}$ -markierten Histidins

Die biosynthetische Vorstufe von Histidin ist Ribose-5-Phosphat. Die  $^{13}\text{C}$ -Markierung des Histidins liefert folglich einen direkten Hinweis auf die  $^{13}\text{C}$ -Markierung von Pentosen.

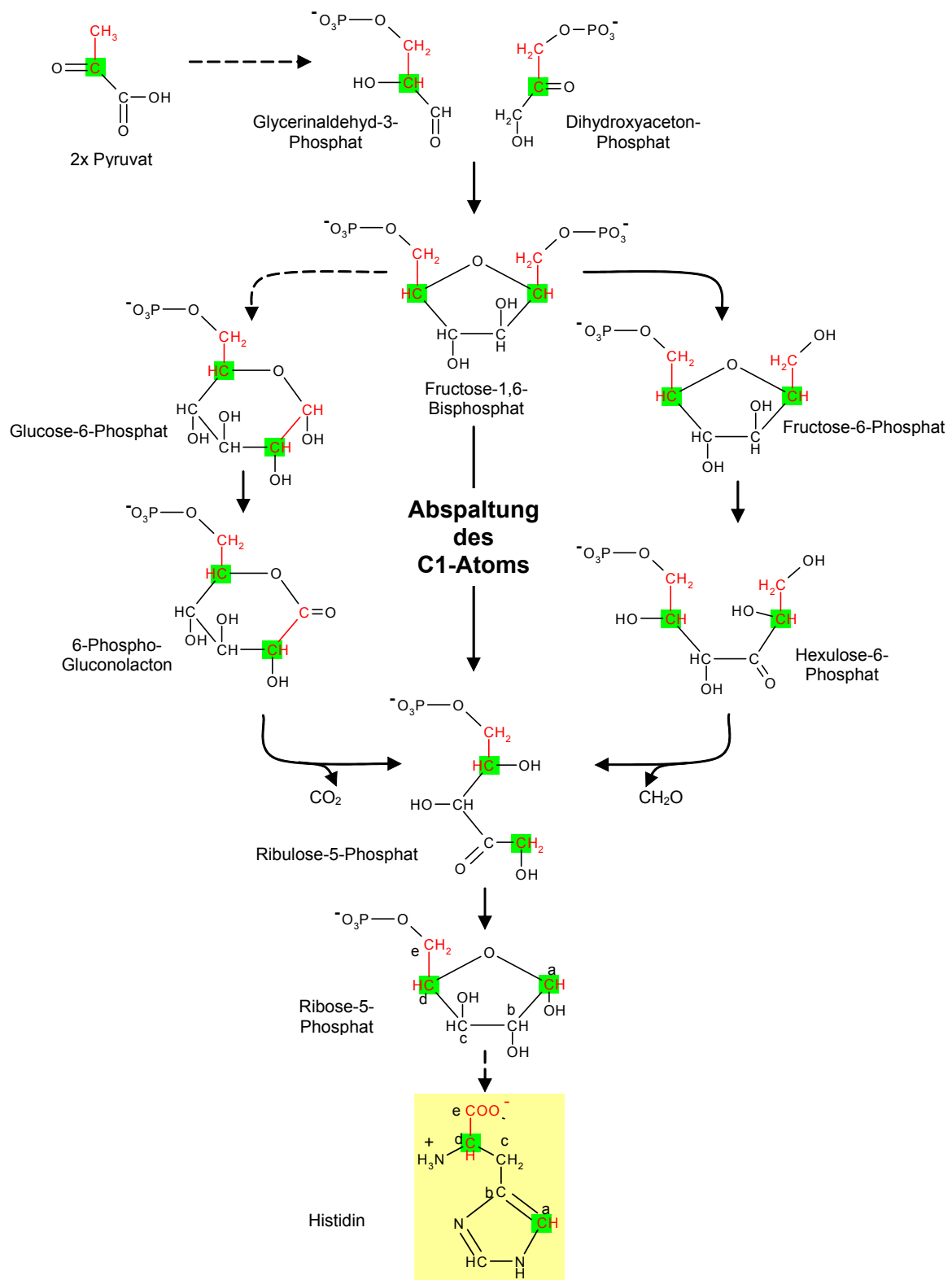
In Tab. 5 wird das erhaltene  $^{13}\text{C}$ -Markierungsmuster der Aminosäure Histidin gezeigt. Die starke  $^{13}\text{C}$ -Markierung an C2 und C5 lässt darauf schließen, dass das Vorläufermolekül Ribose-5-Phosphat stark an C1 und C4  $^{13}\text{C}$ -markiert war.

Tabelle 5:  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den einzelnen Kohlenstoffpositionen von Histidin nach Kultivierung von *I. hospitalis* mit 0,5 mM  $[1-^{13}\text{C}]\text{Acetat}$ . Ebenfalls angegeben sind die äquivalenten Kohlenstoffpositionen in der Vorstufe Ribose-5-Phosphat. Positionen mit hoher  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung sind rot markiert.

Aminosäure	Position	Chemical shift [ppm]	Rel. $^{13}\text{C}$ [%]	Vorstufe
Histidin	1	165,5	3,1	5 (Ribose-5-Phosphat)
	2	51,6	13,5	4 (Ribose-5-Phosphat)
	3	21,3	1,1	3 (Ribose-5-Phosphat)
	4	134,1	2,4	2 (Ribose-5-Phosphat)
	5	118,2	15,0	1 (Ribose-5-Phosphat)
	6	146,1	1,3	

Die Biosynthese von Ribose-5-Phosphat wurde entsprechend der  $^{13}\text{C}$ -Markierung des Histidins und der in 1.2.4.1 ermittelten  $^{13}\text{C}$ -Markierung des Pyruvats rekonstruiert (Abb. 11). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass in *I. hospitalis* Gluconeogenese über den rückwärts gerichteten Embden-Meyerhoff-Weg stattfindet. Die abgeleitete Markierung von Hexosephosphat an den Positionen C2 und C5 stimmt mit der Synthese von Fructose-1,6-Bisphosphat aus C2-markierten Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Dihydroxyaceton-Phosphat (aus 2 Molekülen C2-markiertem Pyruvat) überein.

Das an C1 und C4 markierte Ribose-5-Phosphat wurde demnach durch die Abspaltung des C1-Kohlenstoffatoms aus C2- und C5-markiertem Hexosephosphat gebildet. Pentosephosphat könnte demnach aus Hexosephosphat durch Oxidation und Freisetzung von C1 als  $\text{CO}_2$  im klassischen Pentosephosphat-Weg entstanden sein. Es könnte jedoch auch im neuartigen archaeeellen Ribulose-Monophosphat-Weg durch die Abspaltung von C1 als Formaldehyd aus Hexosephosphat synthetisiert worden sein. Beide Wege würden zu identischen Markierungsmustern der resultierenden Pentosephosphate führen (gezeigt in Abb. 11).



**Abb. 11:** Biosynthese von Histidin über Fructose-6-Phosphat aus zwei Molekülen Pyruvat.

Links: Bildung von Ribulose-5-Phosphat durch oxidative Carboxylierung im oxidativen Pentosephosphat-Weg.

Rechts: Bildung von Ribulose-5-Phosphat über den Ribulose-Monophosphat-Weg.

Der Bereich der Metaboliten, der aus dem Acetatmolekül entstanden ist, ist durch rote Schrift gekennzeichnet. Die  $^{13}\text{C}$ -markierten Positionen sind grün hinterlegt. Die kleinen Buchstaben in Histidin und Ribose-5-Phosphat kennzeichnen die biosynthetisch äquivalenten Kohlenstoffatome. Die  $^{13}\text{C}$ -Markierung des gelb hinterlegten Histidin-Moleküls wurde per NMR nachgewiesen. Die  $^{13}\text{C}$ -Markierung an C2 von Pyruvat wurde in 1.2.4.1 ermittelt.

### 1.3.2. Glycolyse

In Zellextrakten von *I. hospitalis* wurden die Aktivitäten charakteristischer Enzyme der Gluconeogenese nachgewiesen. Die Aktivität von Enzymen der Gluconeogenese spricht gegen den Abbau von Glucose über die Glycolyse in einem Organismus (Verhees et al., 2003), da diese beiden gegenläufigen Stoffwechselwege nicht gleichzeitig in einer Zelle vorkommen.

Im Genom von *I. hospitalis* wurden keine Gene für die Schlüsselenzyme des Glycolyse gefunden. Dazu zählen die Glucokinase oder die Phosphofructo-Kinase eines (modifizierten) Embden-Meyerhoff-Wegs.

Zudem wurde in Zellextrakten keine Aktivität der Pyruvat-Kinase nachgewiesen (siehe 1.2), und auch das entsprechende Gen fehlte im Genom. Jedoch muss hier erwähnt werden, dass in Archaeen die PEP-Synthase auch als Pyruvat-Kinase arbeiten kann (Imanaka et al., 2006).

Im Genom fehlten des Weiteren Gene für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (EC: 1.2.7.6) und die nicht phosphorylierende,  $\text{NAD}^+$  oder  $\text{NADP}^+$ -abhängige Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (EC:1.2.1.9 bzw. EC:1.2.1.59). Diese beiden Enzyme sind Schlüsselenzyme in der archaeellen Glycolyse (Verhees et al., 2003). Die nachgewiesene phosphorylierende,  $\text{NAD}^+$  oder  $\text{NADP}^+$ -abhängige Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (EC:1.2.1.12) ist wahrscheinlich an der Gluconeogenese beteiligt (siehe 1.3.1.1).

Gene, die für glycolytische Enzyme des nicht-phosphorylierenden oder phosphorylierenden Entner-Doudoroff-Wegs kodieren könnten, wurden ebenfalls nicht entdeckt.

## 1.4. Biosynthese von aromatischen Aminosäuren, Leucin und Isoleucin

Wie aus den retrobiosynthetischen Analysen der  $^{13}\text{C}$ -markierten Aminosäuren ersichtlich wurde, verläuft in *I. hospitalis* die Biosynthese der meisten Aminosäuren auf konventionellen Wegen. Für die aromatischen Aminosäuren, sowie für Leucin und Isoleucin wurden jedoch Abweichungen von den konventionellen Wegen festgestellt.

### 1.4.1. Biosynthese aromatischer Aminosäuren

Für die Biosynthese aromatischer Aminosäuren sind zwei Wege bekannt. Der klassische Shikimat-Weg, der mit Erythrose-4-Phosphat und PEP beginnt, und der relativ unübliche Aspartat-Semialdehyd-Weg, der von L-Aspartat-Semialdehyd und 6-Deoxy-5-Keto-Fructose-1-Phosphat ausgeht. Bacteria und Eukaryota nutzen den Shikimat-Weg, bei Archaea ist die Biosynthese aromatischer Aminosäuren weitgehend unerforscht. Der Aspartat-Semialdehyd-Weg zur Biosynthese aromatischer Aminosäuren wurde bei *Methanocaldococcus jannaschii* entdeckt (White, 2004) und auf der Basis genomischer Analysen auch für mehrere andere Euryarchaeota vorgeschlagen (Soderberg, 2005). Für Crenarchaeota hingegen wurde aufgrund genomischer Analysen der klassische Shikimat-Weg zur Synthese von aromatischen Aminosäuren vorgeschlagen (Soderberg, 2005).

#### 1.4.1.1. Retrobiosynthetische Analyse der $^{13}\text{C}$ -markierten, aromatischen Aminosäuren

Tab. 6 zeigt die Ergebnisse der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin. Auffallend sind bei beiden Aminosäuren starke  $^{13}\text{C}$ -Markierungen an C2 und C4, sowie erhöhte  $^{13}\text{C}$ -Werte an den Kohlenstoffpositionen 6/8 des aromatischen Rings. Bei Tyrosin tritt zudem noch eine leicht erhöhte  $^{13}\text{C}$ -Markierung an den Ringpositionen 5/9 auf.

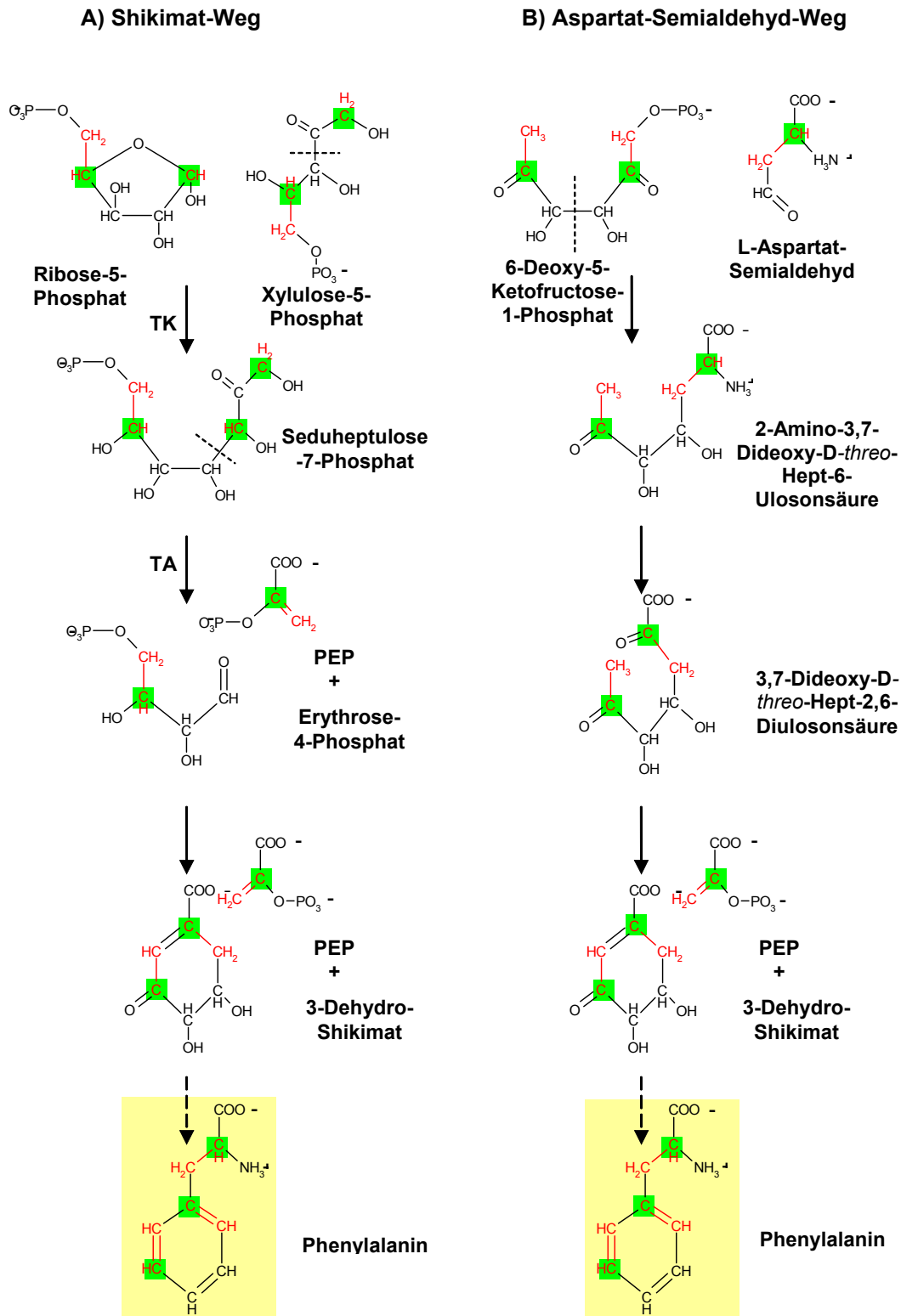
Tabelle 6:  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den einzelnen Kohlenstoffpositionen der aromatischen Aminosäuren nach Kultivierung von *I. hospitalis* mit 0,5 mM  $[1-^{13}\text{C}]$ Acetat. Positionen mit hoher  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung sind rot markiert. n.d: nicht detektiert.

Aminosäure	Position	Chemical shift $\delta[\text{ppm}]$	Rel. $^{13}\text{C}$ [%]	Aminosäure	Position	Chemical shift $\delta[\text{ppm}]$	Rel. $^{13}\text{C}$ [%]
Phenylalanin	1	182.4	n.d.	Tyrosin	1	183.4	1.1
	2	57.4	44		2	57.9	43
	3	40.7	4		3	40.3	5
	4	138.2	26.9		4	123.6	22.7
	5/9	129.4	2.6		5/9	131.1	7.6
	6/8	128.5	5.4		6/8	119.1	9.9
	7	126.6	1.1		7	165.0	n.d.

Sowohl der Shikimat-Weg, als auch der Aspartat-Semialdehyd-Weg führen zur Biosynthese von 5-Dehydroshikimat, der Vorstufe aromatischer Aminosäuren. Abb. 12 zeigt am Beispiel von Phenylalanin die  $^{13}\text{C}$ -Markierungen, die nach der Kultivierung auf  $[1-^{13}\text{C}]\text{Acetat}$  über beide Biosynthesewege in *I. hospitalis* für aromatische Aminosäuren erhalten werden könnten. Im Shikimat-Weg würde eine Synthese von 5-Dehydroshikimat über eine Kondensation von Erythrose-4-Phosphat und PEP erfolgen. Im Aspartat-Semialdehyd-Weg würde die Synthese von Dehydroshikimat dagegen über die Kondensation von L-Aspartat-Semialdehyd und den Positionen C1 bis C3 des 6-Deoxy-5-Ketofructose-1-Phosphats erfolgen. Die resultierenden Markierungsmuster aromatischer Aminosäuren wären bei beiden Wegen identisch und stimmen mit dem detektierten Markierungsmuster von Phenylalanin und Tyrosin aus *I. hospitalis* überein. Die leicht erhöhte Markierung an der Orthoringposition 5/9 in Tyrosin könnte für eine Beteiligung des Aspartat-Semialdehyd-Wegs sprechen. Das eingebaute L-Aspartat-Semialdehyd könnte wie seine Vorstufe Oxalacetat an der C3-Position schwach markiert sein, was durch die reversiblen Reaktionen von Oxalacetat zu den symmetrischen Succinat und Fumarat (1.2.4.2) erklärbar ist.

#### 1.4.1.2. Genomanalyse

Im Genom wurden Gene entdeckt, welche für die zwei charakteristischen Enzyme des klassischen Shikimat-Wegs, die 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat-Synthase (Gen 1397) und die 3-Dehydrochinat-Synthase (Gen 18) kodieren könnten. Zusätzlich wurden mutmaßliche Gene für eine Transketolase (Gene 1228 und 861) gefunden. Dieses Gen fehlt allen Organismen, die den Aspartat-Semialdehyd-Weg zur Biosynthese aromatischer Aminosäuren nutzen (Soderberg, 2005). Auch weitere mögliche Gene für Enzyme des Shikimat-Wegs wurden gefunden. Gene für Enzyme des Aspartat-Semialdehyd-Wegs (eine neuartige Aldolase (COG 1830) und 3-Dehydrochinat-Synthase (COG 1465)) wurden nicht gefunden.



**Abb. 12 A,B:** Alternative Wege zur Biosynthese von Phenylalanin.

**A:** Synthese von Dehydroshikimat über den konventionellen Shikimat-Weg aus Erythrose-4-Phosphat und PEP.

**B:** Synthese von Dehydroshikimat über 6-Deoxy-5-Ketofructose-1-Phosphat und L-Aspartat-Semialdehyd.

Für das Markierungsmuster von Erythrose-4-Phosphat wurde dessen Synthese über den nicht oxidativen Pentosephosphat-Weg angenommen. TK = Transketolase. TA = Transaldolase. Die Muster der Kohlenhydrate wurden aus der retrobiosynthetischen Analyse des Histidins (1.3.1.3) bezogen. Das Markierungsmuster von Aspartat-Semialdehyd wurde vom erhaltenen Muster von Aspartat (1.2.4.1) übernommen, das Markierungsmuster von PEP wurde ebenfalls in 1.2.4.1 bestimmt. Der Bereich der Metaboliten, der aus dem Acetatmolekül entstanden ist, ist durch rote Schrift gekennzeichnet. Die  $^{13}\text{C}$ -markierten Positionen sind grün hinterlegt. Die  $^{13}\text{C}$ -Markierung der gelb hinterlegten Phenylalanin-Moleküle wurde in der NMR-Analyse erhalten.

### 1.4.2. Biosynthese von Lysin

Für die Biosynthese von Lysin sind zwei Wege beschrieben: der bekannte Diaminopimelat-Weg, der von den Vorstufen Pyruvat und Aspartat ausgeht, oder der eher unübliche 2-Aminoadipat-Weg. Der Diaminopimelat-Weg wird im Allgemeinen von allen Pflanzen, Bacteria und niedrig entwickelten Pilzen genutzt (Vogel, 1965). Höher entwickelte Pilze nutzen den 2-Aminoadipat-Weg (Bhattacharjee, 1985). Dieser wurde auch im Archaeum *Thermoproteus neutrophilus* (Schäfer et al., 1989) nachgewiesen und für Bacteria der Gattung *Thermus* aufgrund genomischer Analysen vorgeschlagen (Zabriskie und Jackson, 2000).

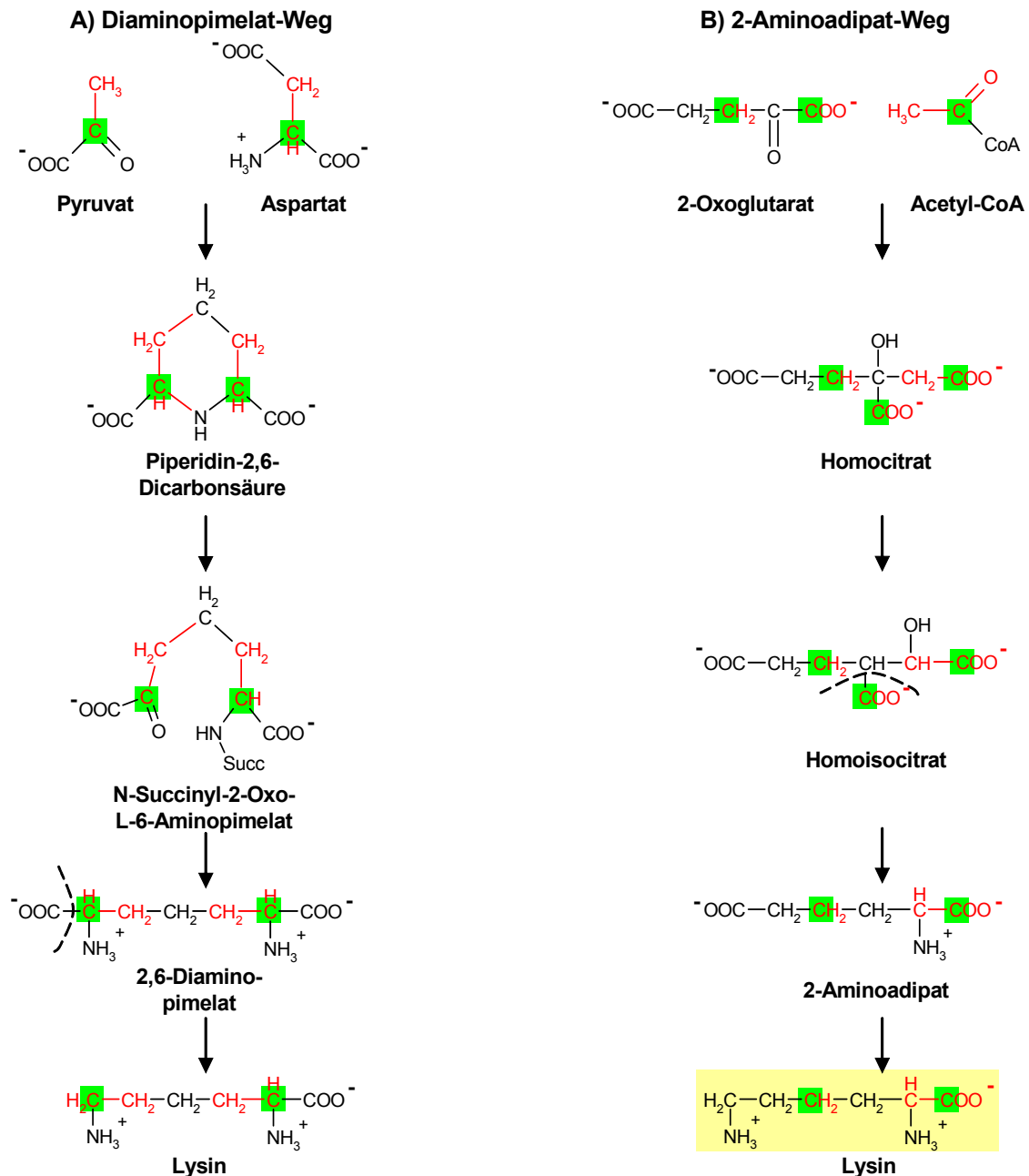
#### 1.4.2.1. Retrobiosynthetische Analyse des $^{13}\text{C}$ -markierten Lysins

In Tab. 7 werden die Ergebnisse der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie von Lysin gezeigt. Auffallend sind starke  $^{13}\text{C}$ -Markierungen an C1 und C4.

Tabelle 7:  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den einzelnen Kohlenstoffpositionen von Lysin nach Kultivierung von *I. hospitalis* mit 0,5 mM  $[1-^{13}\text{C}]$ Acetat. Positionen mit hoher  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung sind rot markiert.

Aminosäure	Position	Chemical shift [ppm]	Rel. $^{13}\text{C}$ [%]
Lysin	1	171,9	22,6
	2	51,5	7,6
	3	27,0	6,9
	4	18,7	26,3
	5	23,5	7,7
	6	36,2	1,1

Abb. 13 zeigt die jeweiligen  $^{13}\text{C}$ -Markierungen für Lysin, die in *I. hospitalis* nach der Markierung mit  $[1-^{13}\text{C}]$ Acetat über den Diaminopimelat-Weg (Abb. 13 A) oder den 2-Aminoadipat-Weg (Abb. 13 B) erhalten werden könnten. Der Diaminopimelat-Weg beginnt mit einer Kondensation der Vorstufen PEP und Aspartat zu Piperidin-2,6-Dicarbonsäure. Diese wird in 2,6-Diaminopimelat überführt, der Vorstufe von Lysin. Wie zu erkennen ist, würde dieser Weg zu einer  $^{13}\text{C}$ -Markierung an C2 und C6 des Lysins führen. Im 2-Aminoadipat-Weg werden 2-Oxoglutarat und Acetyl-CoA kondensiert. Analog zum Tricarbonsäure-Zyklus wird das entstehende Homocitrat in Homoisocitrat umgewandelt, aus dem durch Decarboxylierung 2-Oxadipat entsteht. Dieses wird in 2-Aminoadipat umgewandelt, das als Vorstufe von Lysin dient. Die hohe  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung an C1 und C4 von Lysin aus den auf  $[1-^{13}\text{C}]$ Acetat kultivierten *I. hospitalis*-Zellen stimmt eindeutig mit diesem Syntheseweg überein (Abb. 13).



**Abb. 13 A,B:** Alternative Wege zur Biosynthese von Lysin.

**A:** Synthese von Lysin über den Diaminopimelat-Weg aus Aspartat und Pyruvat.

**B:** Synthese von Lysin über den 2-Amino adipat-Weg aus 2-Oxoglutarat und Acetyl-CoA.

Die Markierungsmuster für Aspartat, Pyruvat, 2-Oxoglutarat und Acetyl-CoA wurden von 1.2.4.1 übernommen. Der Bereich der Metaboliten, der aus dem Acetatmolekül entstanden ist, ist durch rote Schrift gekennzeichnet. Die  $^{13}\text{C}$ -markierten Positionen sind grün hinterlegt. Das per NMR nachgewiesene  $^{13}\text{C}$ -Markierungsmuster für Lysin ist gelb hinterlegt.

Im Genom von *I. hospitalis* wurden keine Gene gefunden, die für die Schlüsselenzyme beider Wege kodieren könnten. Es wurden lediglich mögliche Gene für eine Succinyl-Diaminopimelat-Desuccinylase (Gen 309 und 508), ein Enzym des Diaminopimelat-Wegs, von JGI annotiert.



### 1.4.3. Biosynthese von Isoleucin

Die Biosynthese von Isoleucin kann über den konventionellen Weg aus Threonin oder über den Citramalat-Weg aus Acetyl-CoA und Pyruvat erfolgen. Die meisten Bacteria und Eukaryota nutzen zur Biosynthese von Isoleucin den konventionellen Weg aus Threonin (Umbarger, 1978). Der Citramalat-Weg wurde bisher in der bakteriellen Gattung *Leptospira* (Charon et al., 1974), sowie in methanogenen Archaea (Eikmanns et al., 1983; Ekiel et al., 1984; Howell et al., 1999) und in *Thermoproteus neutrophilus* (Schäfer et al., 1989) nachgewiesen.

#### 1.4.3.1. Retrobiosynthetische Analyse der $^{13}\text{C}$ -markierten Isoleucins

Tab. 8 zeigt die Ergebnisse der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie von Isoleucin. Starke  $^{13}\text{C}$ -Anreicherungen finden sich an den Positionen C1, C3 und C4. In Abb. 14 werden die jeweiligen  $^{13}\text{C}$ -Markierungen für Isoleucin dargestellt, die nach der Markierung mit  $[1-^{13}\text{C}]\text{Acetat}$  in *I. hospitalis* über den konventionellen Biosyntheseweg (Abb. 14 A) oder den Citramalat-Weg (Abb. 14 B) erhalten werden könnten. Beide Wege führen zur Synthese von 2-Oxobutytrat, das mit Acetaldehyd kondensiert, um die Vorstufe des Lysins, 2-Oxo-3-Methylvalerat, zu bilden. Im konventionellen Biosyntheseweg würde 2-Oxobutytrat aus Threonin synthetisiert werden. Dies hätte eine Markierung an C2 und C3 des Isoleucins zur Folge. Das beobachtete  $^{13}\text{C}$ -Markierungsmuster von Isoleucin an C1, C3 und C4 schließt den konventionellen Biosyntheseweg aus, passt jedoch perfekt zur Synthese von 2-Oxobutytrat aus Pyruvat und Acetyl-CoA im Citramalat-Weg.

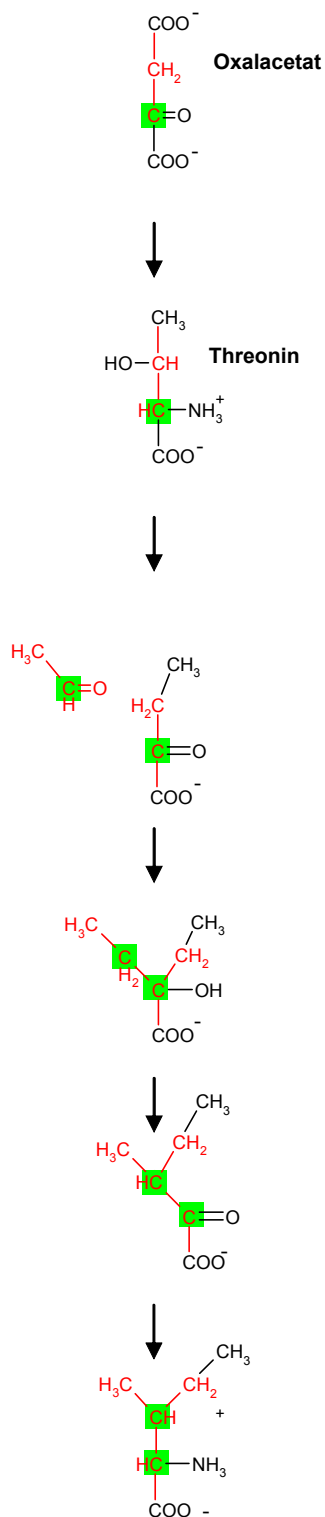
Tabelle 8:  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den einzelnen Kohlenstoffpositionen von Isoleucin nach Kultivierung von *I. hospitalis* mit 0,5 mM  $[1-^{13}\text{C}]\text{Acetat}$ . Positionen mit hoher  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung sind rot markiert.

Aminosäure	Position	Chemical shift [ppm]	Rel. $^{13}\text{C}$ [%]
Isoleucin	1	171,6	18,1
	2	57,6	2,2
	3	39,1	14,9
	4	24,9	6,2
	5	11,4	1,1
	6	14,5	1,3

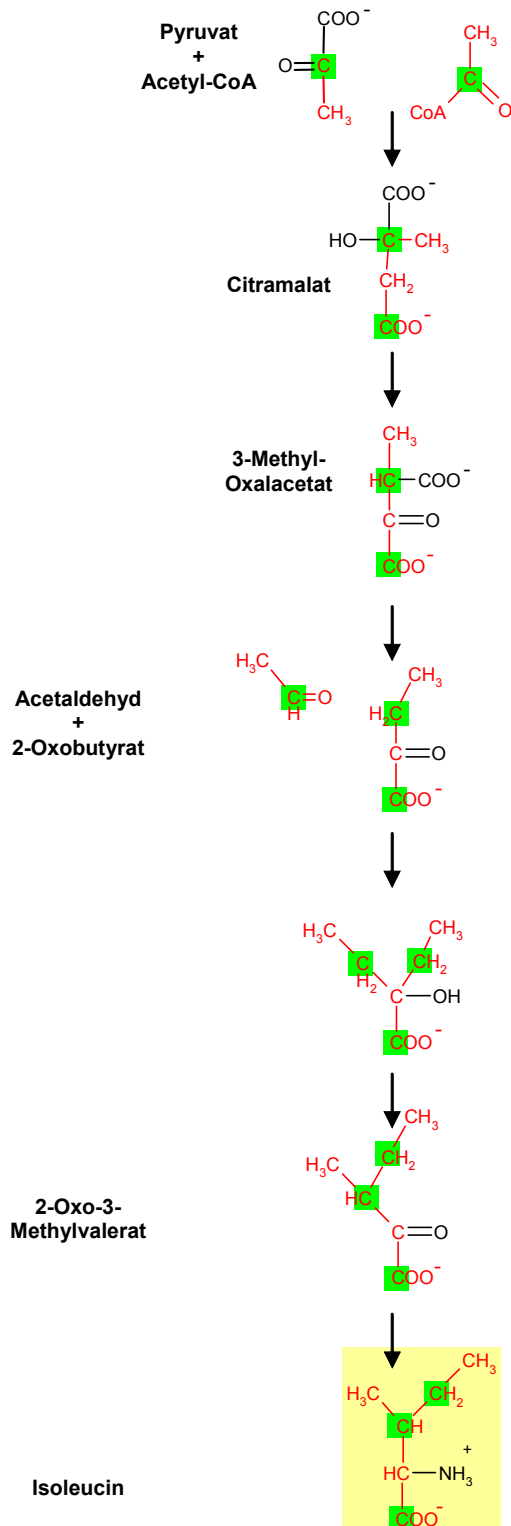
#### 1.4.3.2. Genomanalyse

Im Genom von *I. hospitalis* wurden keine Anhaltspunkte dafür gefunden, welcher der beiden Wege von *I. hospitalis* genutzt wird.

**A) konventioneller Weg**



**B) Citramalat-Weg**



**Abb. 14 A,B:** Alternative Wege zur Biosynthese von Isoleucin.

**A:** Synthese von Isoleucin im konventionellen Weg über 2-Oxobutyrate aus Threonin.

**B:** Synthese von Isoleucin im Citramalat-Weg über 2-Oxobutyrate aus Pyruvat und Acetyl-CoA.

Die Markierungsmuster für Oxalacetat, Pyruvat, Acetaldehyd und Acetyl-CoA wurden von 1.2.4.1 übernommen. Der Bereich der Metaboliten, der aus dem Acetatmolekül entstanden ist, ist durch rote Schrift gekennzeichnet. Die  $^{13}\text{C}$ -markierten Positionen sind grün hinterlegt. Das per NMR nachgewiesene  $^{13}\text{C}$ -Markierungsmuster für Isoleucin ist gelb hinterlegt.

## 2. Lipidzusammensetzung der Membranen von *I. hospitalis* und *N. equitans*

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die Membranlipide folgender Proben untersucht: *I. hospitalis*, gezüchtet bei der minimalen, optimalen und maximalen Wachstumstemperatur (77, 90, und 95 °C), Cokultur aus *I. hospitalis* und *N. equitans* (kultiviert bei 90 °C), sowie aus dieser Cokultur aufgereinigte *N. equitans*-Zellen. Von Daniela Näther (Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg) wurde eine Probe der aufgereinigten, äußeren Membran von den bei 90 °C kultivierten *I. hospitalis*-Zellen erhalten. Die Lipide dieser Fraktion wurden ebenfalls untersucht.

Durch die Lipidanalysen sollten Hinweise auf einen möglichen Lipidtransfer von *I. hospitalis* zu *N. equitans* erhalten sowie – falls vorhanden – spezifische Biomarker für beide Organismen detektiert werden. Des Weiteren sollte die Lipidzusammensetzung der Membran von *I. hospitalis* in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur ermittelt werden. Die Lipidanalyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Roger Summons, Massachusetts Institute of Technology, Boston, USA.

### 2.1. Lipidertrag aus *N. equitans* und *I. hospitalis*-Zellen

Aufgereinigte *N. equitans*-Zellen wiesen den höchsten Lipidgehalt, 16 % der eingesetzten Zellmasse, auf. 80 % der Lipidmasse wurde durch die Lipidextraktion nach Bligh und Dyer, 1959, erhalten, 20 % durch saure Extraktion (Nishihara und Koga, 1987) aus den unlöslichen Resten der vorherigen Extraktion.

Die Cokultur von *I. hospitalis* und *N. equitans* hatte einen Lipidanteil von 6,3 %. Ca. 66 % dieser Lipide entstammten dem ersten, 33 % dem zweiten, sauren Extraktionsschritt.

*I. hospitalis*-Reinkulturen, gezüchtet bei 77, 90 und 95 °C, wiesen mit 3,2, 1,9 bzw. 2,4 % (davon je ca. 20 % aus der zweiten, sauren Extraktion) alle einen sehr geringen Lipidgehalt auf.

Der Lipidgehalt der aufgereinigten, äußeren Membran konnte aufgrund der geringen Probenmasse nicht bestimmt werden.

Der stark erhöhte Lipidanteil in aufgereinigten *N. equitans*-Zellen kann auf die kleine Zellgröße von *N. equitans* zurückgeführt werden. Da *N. equitans*-Zellen nur ein Fünftel des Durchmessers von *I. hospitalis*-Zellen aufweisen (0,4 µm gegenüber 2 µm), sollten sie bei gleichem Volumen (proportional zur eingesetzten Zellmasse) 5x soviel Zelloberfläche (proportional zum Membrananteil) wie *I. hospitalis*-Zellen aufweisen, was die erhaltenen Ergebnisse bestätigen.

## 2.2. Kohlenwasserstoffketten der Lipide

Zur Analyse der Kohlenwasserstoffketten der Lipide wurden diese mit  $\text{BBr}_3$  abgespalten und mit "Superhydride" (Lithium-Triethylborhydrid) in ihre flüchtigen Derivate überführt. Darauf wurden sie gaschromatographisch aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert (GC-MS-Analyse).

In den Chromatogrammen aller Proben (Abb. 15) wurden zwei Kohlenwasserstoffe mit Retentionszeiten von 28,18 min bzw. 60,66 min detektiert. Die Lipidfraktionen aller analysierten Proben wiesen also die gleiche qualitative Kohlenwasserstoffzusammensetzung auf. Die Massenspektren dieser Kohlenwasserstoffe sind in Abb. 16 dargestellt. Sie waren identisch mit den Massenspektren von Phytan bzw. Biphytan aus anderen Archaea.

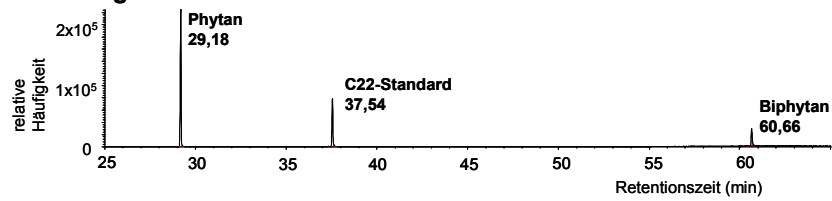
Das Verhältnis von Phytan (28,18 min) zu Biphytan (60,66 min) lag in den Bligh- und Dyer-Extrakten in etwa bei >9:1. Bei den säureextrahierten Lipiden aus den unlöslichen Resten der Bligh- und Dyer-Extraktion wurde ebenfalls nur Archaeol und Caldarchaeol nachgewiesen. Jedoch verschob sich hier das Verhältnis von Archaeol zu Caldarchaeol je nach Probe auf 1:3 bis 2:3 (genaue Daten nicht gezeigt).

Eine Ausnahme stellt die aufgereinigte, äußere Membran von *I. hospitalis* dar. In dieser Fraktion konnte kein Biphytan detektiert werden.

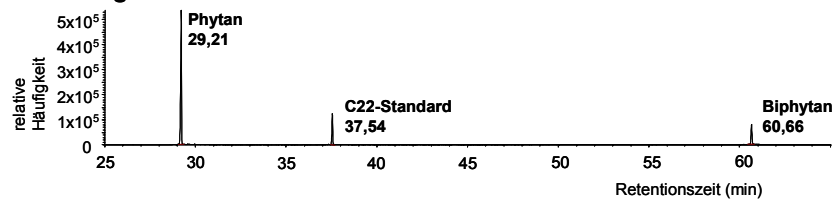
Hydroxygruppen an Kohlenwasserstoffketten würden bei der Inkubation mit  $\text{BBr}_3$  durch Bromid ersetzt und anschließend durch "Superhydride" unter Abspaltung von  $\text{HBr}$  reduziert werden. Sie würden somit in der gaschromatographischen Analyse nicht detektiert werden. Deswegen wurden zur Kontrolle kleine Mengen der Lipidextrakte mit BSFTA/Pyridin derivatisiert und analysiert. Jedoch wurden keine Hydroxygruppen an Isoprenoidketten detektiert, was das Vorhandensein von Hydroxyarchaeol oder Hydroxycaldarchaeol ausschließt.

In den Lipidextrakten wurden zusätzlich Spuren von Phyten und Biphyten (einfach ungesättigtes Phytan bzw. Biphytan, Retentionszeiten 29,18 bzw. 61,30 min) detektiert. Bei einer alternativen Präparationsmethode, einer Hydrolyse der Etherbindungen mit  $\text{HI}$  statt mit  $\text{BBr}_3$ , fehlten diese einfach ungesättigten Kohlenwasserstoffe jedoch. Dies lässt darauf schließen, dass es sich dabei um Artefakte der ersten Präparationsmethode handelt. Die Zufuhr von  $\text{BBr}_3$  hatte offensichtlich eine zu stark oxidierende Wirkung, wodurch die Ausbildung von Doppelbindungen im Kohlenwasserstoffgerüst unter Bildung von  $\text{HBr}$  verursacht wurde.

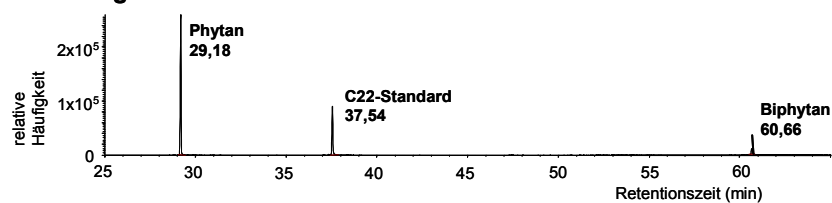
## aufgereinigte *N. equitans*-Zellen, bei 90°C gezüchtet



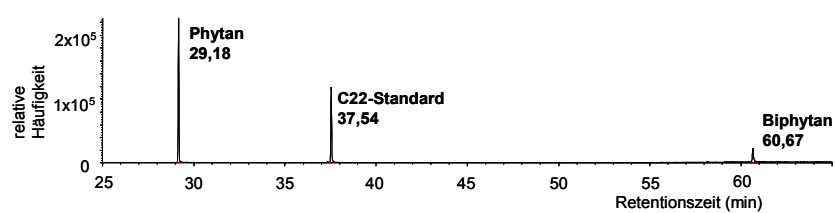
## Cokultur aus *N. equitans* und *I. hospitalis*, bei 90°C gezüchtet



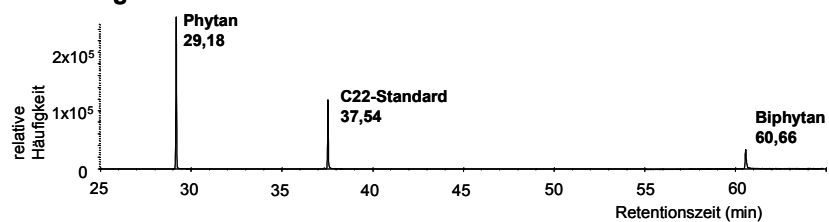
## *I. hospitalis*-Reinkultur, bei 90°C gezüchtet



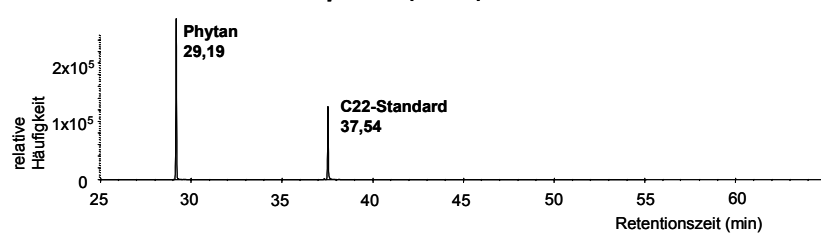
## *I. hospitalis*-Reinkultur, bei 77°C gezüchtet



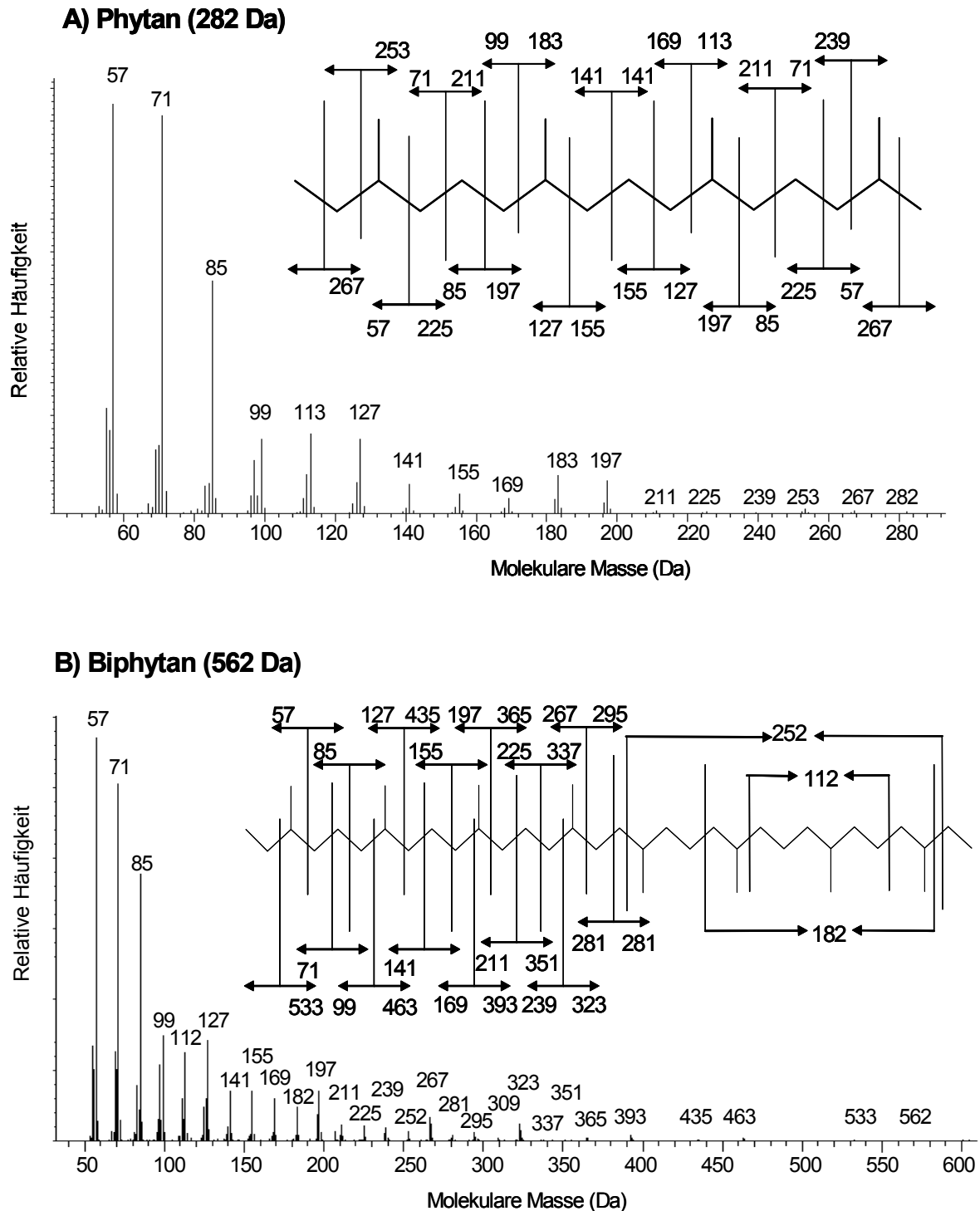
## *I. hospitalis*-Reinkultur, bei 95°C gezüchtet



## äußere Membran von *I. hospitalis* (90 °C)



**Abb. 15:** Gaschromatogramme der aus den Lipidfraktionen präparierten Kohlenwasserstoffe. Gescannt wurde nach Ion 71, einem dominierenden Ion bei der massenspektrometrischen Analyse von Isoprenoidketten (siehe Abb. 16). Die Identifikation der Kohlenwasserstoffe erfolgte durch Massenspektrometrie der detektierten Kohlenwasserstoffe (Abb. 16).



**Abb. 16:** Massenspektrum von A) Phytan und B) Biphytan.

Die massenspektrometrische Analyse erfolgte nach Fragmentierung der gaschromatographisch getrennten Kohlenwasserstoffe durch Elektronenbeschuss. Der Scanbereich der massenspektrometrischen Analyse lag zwischen 50 und 2000 m/z (Verhältnis von Masse zu Ladung; bei einer nach Elektronenbeschuss üblichen Ladung von +1 werden Fragmente zwischen 50 und 2000 Da detektiert). Die detektierten Fragmente waren charakteristisch für Isoprenoidkohlenwasserstoffe. Die molekularen Massen der Fragmente werden durch die eingefügten Fragmentierungsschemata erklärt. Die deutlich größere Menge an Fragmenten mit kleineren molekularen Massen im Gegensatz zu Fragmenten mit größeren molekularen Massen ist eine Folge fortgesetzter Fragmentierung der großen Fragmente.

Tab. 9 zeigt die Zusammensetzung der Kohlenwasserstoffe aus den Lipidextrakten der untersuchten Kulturen. Die Daten repräsentieren die Summe der Kohlenwasserstoffe aus der Bligh- und Dyer- und der Säureextraktion. Während die qualitative Zusammensetzung der Kohlenwasserstoffe bei allen Proben identisch war, wurden Unterschiede in der quantitativen Zusammensetzung sichtbar: Die Kohlenwasserstofffraktion der aufgereinigten *N. equitans*-Zellen enthielt ca. 90 % Phytan und ca. 10 % Biphtan. Der Biphtananteil bei der Cokultur aus *N. equitans* und *I. hospitalis* betrug ca. 20 %. Die bei 90 °C gezüchtete Reinkultur von *I. hospitalis* wies ebenfalls einen Biphtananteil von 20 % auf. In den bei 77 °C und 95 °C gezüchteten *I. hospitalis*-Reinkulturen sank dieser Anteil auf ca. 10 % ab.

Die Lipidzusammensetzung der aufgereinigten, äußeren Membran (100 % Phytan) ist in dieser Tabelle nicht aufgeführt.

Tabelle 9: Vergleich der Kohlenwasserstoffketten aus den Lipidextrakten von *N. equitans* und *I. hospitalis*:

Menge (%; µg pro mg Lipidextrakt, µg pro mg Biomasse) und Isotopenzusammensetzung ( $\delta^{13}\text{C}$ ) der Kohlenwasserstoffe. Die Mengen der Kohlenwasserstoffe repräsentieren die Summe der Produkte aus der Bligh- und Dyer- und der Säureextraktion. Die  $\delta^{13}\text{C}$  Werte sind im Verhältnis zum internationalen Standard VPDB (siehe II. 6.5) dargestellt. Die *N. equitans*-Zellen wurden aus der hier ebenfalls analysierten Cokultur aufgereinigt. P: Phytan, BiP: Biphtan.

Probe	%		µg pro mg Lipidextrakt		µg pro mg Biomasse		$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	
	P	BiP	P	BiP	P	BiP	P	BiP
aufgereinigte <i>N. equitans</i> -Zellen (90 °C)	89,4	10,6	79,6	9,5	12,79	1,52	-16,0	-16,3
Cokultur aus <i>N. equitans</i> und <i>I. hospitalis</i> (90 °)	80,3	19,7	17,6	4,3	1,83	0,45	-16,1	-16,0
<i>I. hospitalis</i> , (77 °C)	89,3	10,7	9,9	1,2	0,31	0,04	-15,2	-15,2
<i>I. hospitalis</i> (90 °C)	80,7	19,3	25,9	6,2	0,48	0,12	-42,1	-43,6
<i>I. hospitalis</i> (95 °C)	90,5	9,5	2,1	0,2	0,04	0,005	-18,6	-19,8

Mittels "Isotope Ratio Mass Spektrometry" wurden zusätzlich die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Phytan und Biphtan in den verschiedenen Proben bestimmt. Diese Werte sind ebenfalls in Tab. 9 dargestellt. Phytan und Biphtan derselben Probe zeigten immer die gleichen  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte. Die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Kohlenwasserstoffen aus verschiedenen Kultivierungsexperimenten variieren hingegen stark. Dies ist eine Folge der Verwendung mehrerer, unterschiedlicher  $\text{CO}_2$ -Chargen während der Zuchten. Die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für die Kohlenwasserstoffketten der Cokultur und der aus dieser Kultur aufgereinigten *N. equitans*-Zellen betragen mit ca. -16 ‰ gleich viel.

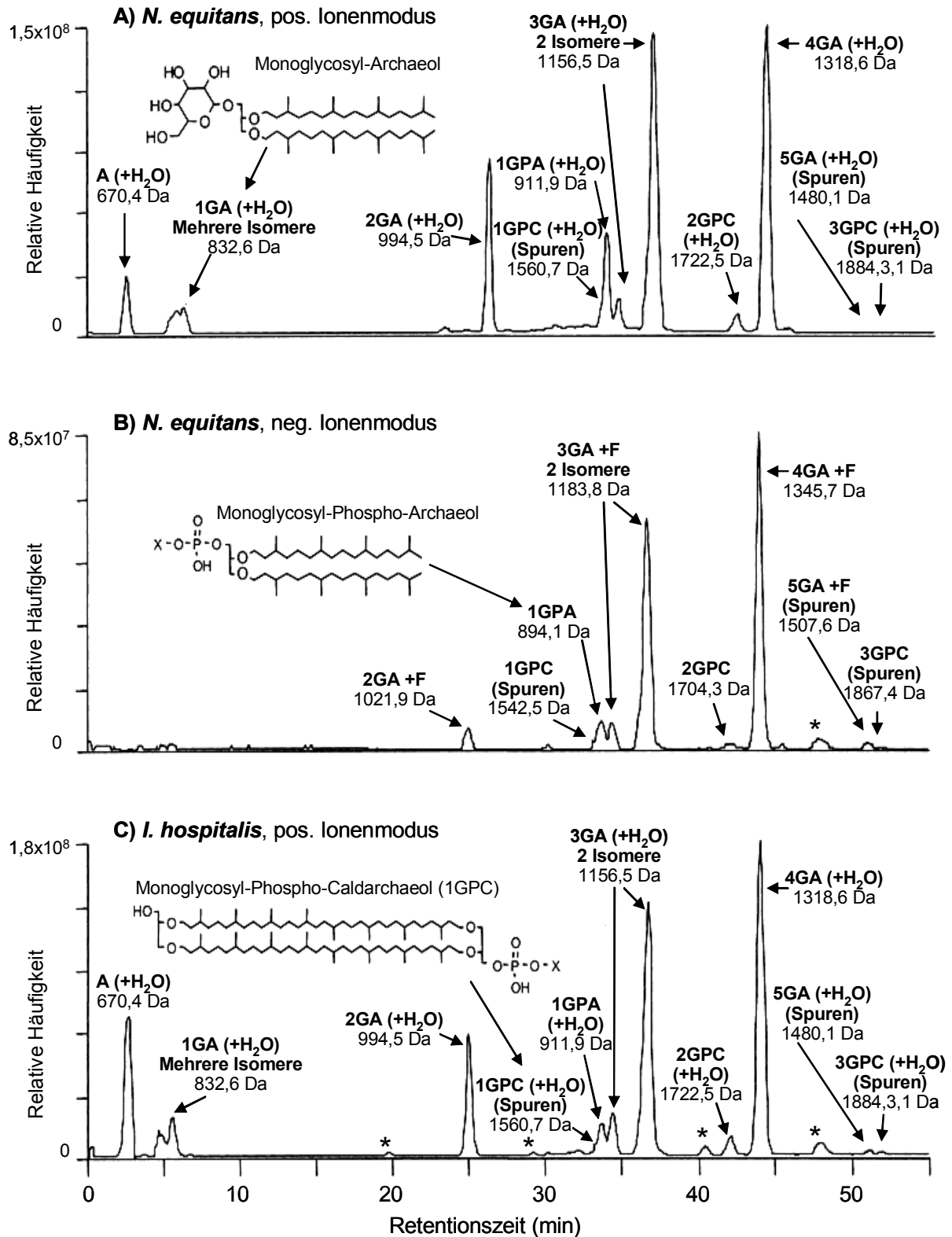
### 2.3. Intakte polare Lipide

Die intakten polaren Lipide in den Lipidextrakten wurden mittels LC-MS untersucht. Dazu wurden sie flüssigchromatographisch aufgetrennt. Die einzelnen Peaks wurden darauf massenspektrometisch analysiert.

Abb. 17 zeigt beispielhaft die Chromatogramme der LC-MS Analyse von *N. equitans* nach der Messung im positiven und im negativen Ionenmodus, sowie das Chromatogramm der Cokultur aus *I. hospitalis* und *N. equitans* nach Messung im positiven Ionenmodus. Die verschiedenen Proben wiesen eine größtenteils übereinstimmende Lipidzusammensetzung auf. Dies wird in Abb. 17 beim Lipidvergleich der Cokultur aus *I. hospitalis* und *N. equitans* mit den aufgereinigten *N. equitans*-Zellen gezeigt, traf jedoch auch für die anderen Proben zu. Deutliche Unterschiede wiederum wurden in den prozentualen Anteilen der einzelnen Lipide verzeichnet.

Die einzelnen Peaks wurden aus den stärksten Ionensignalen eines Moleküls ermittelt. Die Detektion erfolgte im Scanbereich 650-2000 m/z. Für die Lipide wurden, je nachdem ob im positiven oder negativen Ionenmodus gemessen wurde, unterschiedlich starke Signale erhalten. Bei der Messung im negativen Ionenmodus nahm die Signalstärke zudem generell um die Hälfte gegenüber der Messung im positiven Ionenmodus ab (siehe Abb. 17 A und B). Jedoch war bei dieser Messmethode das Hintergrundrauschen geringer, so dass kleine Peaks stärker in den Vordergrund traten. Dies ist in Abb. 17 A und B bei 5-Glycosyl-Archaeol (5GA) oder bei 3-Glycosyl-Phospho-Caldarchaeol (3GPC) gut zu erkennen.



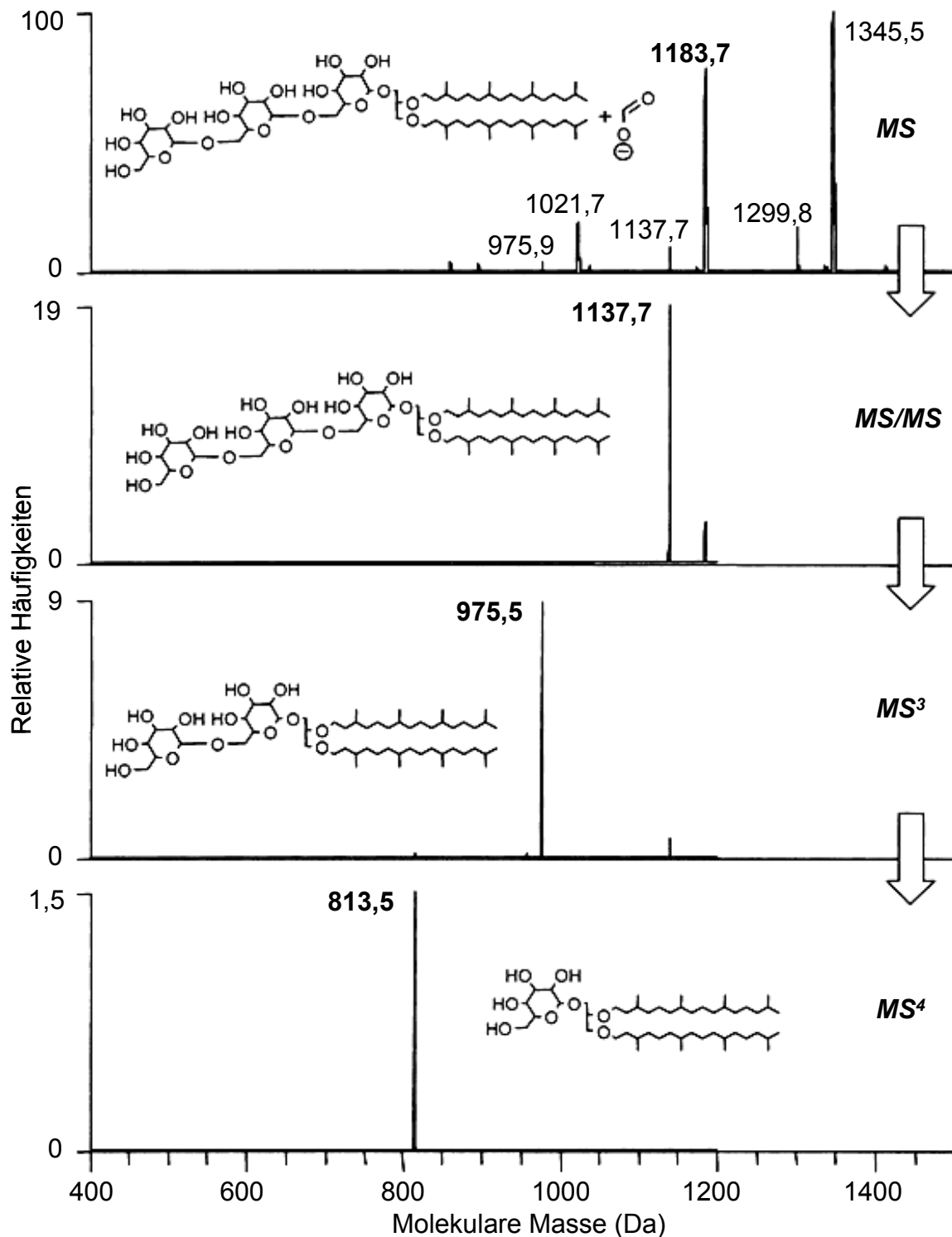


**Abb. 17 A,B,C:** Chromatogramme der LC-MS-Analyse von *N. equitans*. (A: positiver, B: negativer Ionenmodus), und der Kokultur KIN4/M aus *N. equitans* und *I. hospitalis* (C: positiver Ionenmodus). Die massenspektrometrische Analyse erfolgte nach Fragmentierung der flüssigchromatographisch getrennten Lipide durch Elektronen- bzw. Protonenbeschuss. Der Scanbereich der massenspektrometrischen Analyse lag zwischen 650 und 2000 m/z. +F: Formiataddukt, +H<sub>2</sub>O: Wasseraddukt. Die den Peaks zugeordneten Lipide sind folgendermaßen abgekürzt: 1-5: Anzahl der Glycosyleinheiten, G: Glycosylrest, P: Phosphatrest, A: Archaeol, C: Caldarchaeol, \* = nicht identifizierbares Signal. X: Zuckereinheit, über Phosphat an das Lipid gebunden.

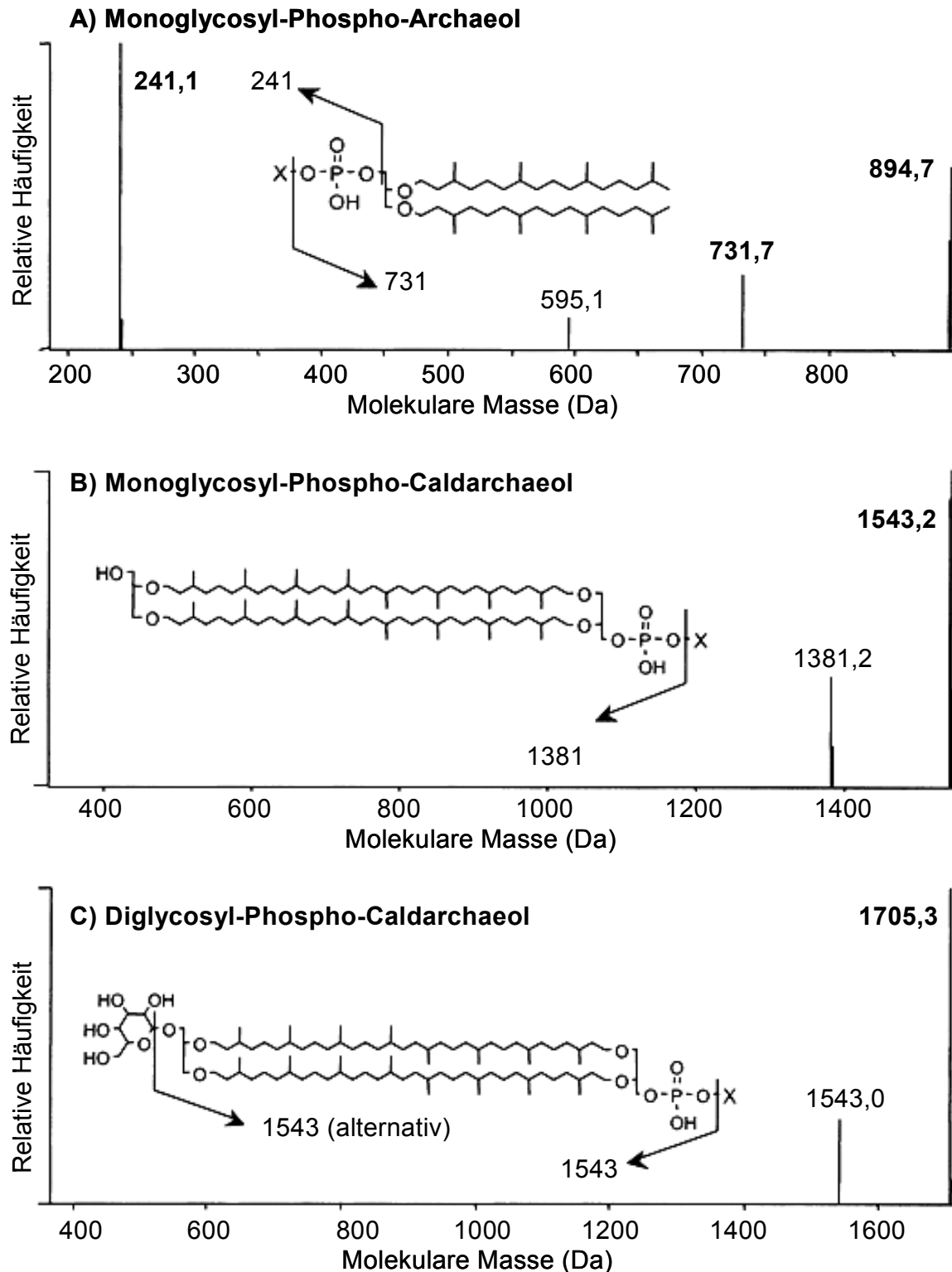
Die Identifikation der Lipide erfolgte über ihre Retentionszeiten in der flüssigchromatographischen Auftrennung sowie über massenspektrometrische Analysen. Die erhaltenen Massenspektren wurden mit denen von Standardlipiden (aus *Methanocaldococcus jannaschii*, *Methanopyrus kandleri*, *Methanothermus fervidus* und *Sulfolobus shibatae*; Ferrante et al. 1990; Hafenbradl et al. 1996; Sprott et al. 1997; Sugai et al. 1995) verglichen. Die Identifikation von glycosylierten Phospholipiden erfolgte im Vergleich mit Phospho-Archaeol-Standards und n-Glycosyl-Phospho-Diacyl-Standards.

Abb. 18 zeigt anhand von Triglycosyl-Archaeol beispielhaft die Identifizierung von Glycolipiden. Das zu analysierende Glycolipid wird durch Elektronenbeschuss mehrfach hintereinander fragmentiert und nach jeder Fragmentation massenspektrometrisch analysiert. Triglycosyl-Archaeol hat als Formiataddukt (+ 45 Da) eine molekulare Masse von 1183 kDa. Jede abgespaltene Glycosylgruppe führt zu einer Gewichtsreduktion des Lipids um 162 kDa, bis schließlich Monoglycosyl-Archaeol mit einer molekularen Masse von 813 Da vorliegt.

In Abb. 19 wird die Identifizierung von Phospholipiden anhand der Massenspektren von Monoglycosyl-Phospho-Archaeol, Monoglycosyl-Phospho-Caldarchaeol und Diglycosyl-Phospho-Caldarchaeol veranschaulicht. Über hochauflösende LC-MS an Glycosyl-Phospho-Archaeol wurde gezeigt, dass die Lipide tatsächlich eine Phosphat- und keine Sulfatgruppe enthalten. Ergebnisse der hochauflösenden Massenbestimmung des 895,7 Da großen Ions stimmten genau mit Ergebnissen für Phospholipide und nicht mit denen für Sulpholipide überein. Sulpholipide würden eine um 2 Da größere molekulare Masse besitzen. Sie wurden aufgrund der erhaltenen Isotopenmuster ausgeschlossen, die nicht mit Isotopenmustern eines um 2 Da größeren Moleküls kompatibel waren. Das 1705 Da große Ion in Abb. 19 C entspricht dem Diglycosyl-Phospho-Caldarchaeol. Diglycosyl-Phospho-Caldarchaeol ( $C_{98}H_{192}O_{19}P^+$ ) sollte eine molekulare Masse von 1704,38 Da aufweisen. Die tatsächliche, um 1 Da größere, molekulare Masse weist darauf hin, dass dieses Molekül ein  $^{13}C$ -Atom enthält, wie es für Moleküle dieser Größe üblich ist. Bei Abspaltung eines Glycosylrestes (162 Da) erhält man ein 1543 Da großes Ion, bei Abspaltung des zweiten Glycosylrestes ein 1381 großes Ion. Die Lipidstruktur, die in Abb. 19 C eingefügt wurde, zeigt eine mögliche Anordnung der Glycosyluntereinheiten an Diglycosyl-Phospho-Caldarchaeol. Da kein Diglycosyl-Phospho-Archaeol beobachtet wurde, ist vermutlich auch beim n-Glycosyl-Phospho-Caldarchaeol nur eine Glycosyleinheit am Phosphat angeheftet, und weitere Glycosyleinheiten am gegenüberliegenden Glycerin.



**Abb. 18:** MS<sup>n</sup>-Spektrum (negativer Ionenmodus) des Lipids (1183 Da), das als Triglycosyl-Archaeol identifiziert wurde. Im ersten MS-Spektrum wurde eine Mischung verwandter Glycolipide mit molekularen Massen von 1021, 1183 und 1345 Da beobachtet. Diese entsprechen den molekularen Massen von Di-, Tri-, oder Tetraglycosyl-Archaeol, als Formiataddukte (+ 45 Da) vorliegend. Die Peaks mit den Massen 975, 1137 und 1299 Da entsprechen den äquivalenten aber formiatfreien Glycolipiden. Das MS/MS-Spektrum des Formiataddukts bei 1183 Da zeigte ein dominierendes Ion bei 1137 Da, entsprechend dem Verlust von Formiat. Im MS<sup>3</sup>-Spektrum konnte ein Verlust der Glycosylgruppe (-162 Da) beobachtet werden, eine weitere Glycosylgruppe ging im MS<sup>4</sup>-Spektrum verloren. Eine ähnliche Analyse von Diglycosyl-Archaeol im positiven Ionenmodus (994 Da) ergab Fragmente in der Größe von 653 Da (Archaeol) und 373 Da (Archaeol, von dem ein Phytanyl abgespalten wurde).

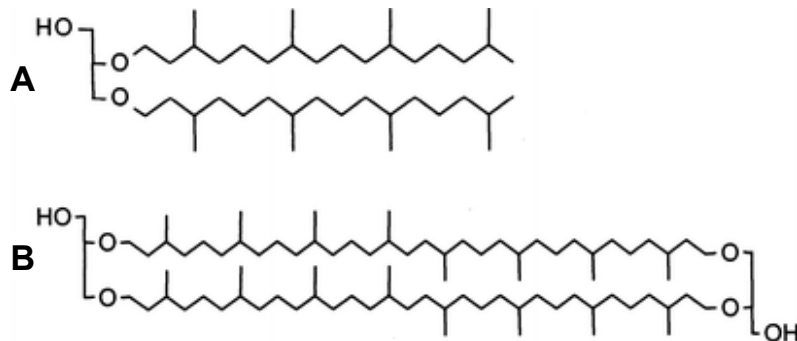


**Abb. 19 A,B,C:** MS/MS-Spektrum (negativer Ionenmodus) von drei glycosilierten Phospholipiden. Diese Lipide wurden in den Lipidextrakten von *N. equitans* und *I. hospitalis* gefunden. Im Gegensatz zu Glycolipiden bilden Phospholipide keine Formiataddukte.

Das Spektrum in **Abb. 19 A** wurde als Monoglycosyl-Phospho-Archaeol (Peak bei 33 min in Abb. 17) identifiziert. Das 241 Da große Ion ist diagnostisch für Glycosyl-Phospho-Lipide und entspricht der Glycosyl-Phosphat-Kopfgruppe. Das 731 Da große Ion entspricht einem Phospho-Archaeol und wird bei Phospho-Archaeol-Standards mit verschiedenen Kopfgruppen beobachtet. Die genaue Struktur der angehefteten Glycosyleinheit konnte über diese Analyse nicht bestimmt werden. Die Spektren in **Abb. 19 B** und **C** wurden als n-Glycosyl-Phospho-Caldarchaeole mit einer Phosphat- und einer (**B**) oder zwei (**C**) Glycosylgruppen, die mit der Phosphatgruppe oder dem Glycerin verknüpft sind, identifiziert.

X: Zuckereinheit, über Phosphat an das Lipid gebunden.

Die Lipidkerne der intakten Lipide aller Proben bestanden aus 2,3-di-O-Phytanyl-Glycerin-Diether (Archaeol) und Glycerin-Dibiphytanyl-Glycerin-Tetraether (GDGT oder Caldarchaeol). Die Strukturen dieser Lipide sind in Abb. 20 gezeigt.



**Abb. 20 A,B:** Strukturen der archaeellen Kernlipide:

**A:** Archaeol;  
**B:** Glycerin-Dibiphytanyl-Glycerin-Tetraether oder Caldarchaeol

In allen analysierten Lipidextrakten dominierten Glycolipide mit einem Archaeolkern und 1-5 Zuckerresten. In geringen Mengen wurden Phospholipide mit Caldarchaeol- oder Archaeolkernen und einem oder mehreren Zuckerresten gefunden. Von bestimmten Lipiden waren in der LC-MS-Analyse auch Isomere sichtbar. Diese wiesen bei identischen Massenspektren unterschiedliche Retentionszeiten auf. Sie könnten durch die Anheftung verschiedener Hexosen oder durch andere Formen der Isomerie entstanden sein.

Tab. 10 zeigt die Zusammensetzung der intakten polaren Lipide aus den Lipidfraktionen der aufgereinigten *N. equitans*-Zellen, der Cokultur und den bei 90, 77 und 95 °C gezüchteten *I. hospitalis*-Reinkulturen. Die Zusammensetzung der äußeren Membran von *I. hospitalis* ist ebenfalls dargestellt. Der Vergleich zeigt, dass es keine Unterschiede in der qualitativen Zusammensetzung der intakten polaren Membranlipide zwischen *N. equitans* und *I. hospitalis* gibt. Auch die bei 77, 90 und 95 °C gezüchteten *I. hospitalis*-Zellen weisen alle das gleiche Lipidmuster auf. Die einzige Abweichung von diesem allgemeinen Lipidmuster wurde bei der aufgereinigten, äußeren Membran von *I. hospitalis* verzeichnet. In dieser wurden bei der LC-MS-Analyse keine intakten polaren Lipide mit Caldarchaeol-Kern detektiert. Dieses Ergebnis bestätigte die Ergebnisse der Kohlenwasserstoffanalyse, in denen kein Biphytan nachgewiesen wurde.

### III. Ergebnisse

Tabelle 10: Intakte polare Lipide aus den Membranfraktionen von *I. hospitalis* und *N. equitans*.  
 –: nicht detektierbar, +: weniger als 20%, ++: zwischen 20 und 50%, +++: mehr als 50%,  
 GDGT: Glycerin-Dibiphytanyl-Glycerin-Tetraether oder Caldarchaeol

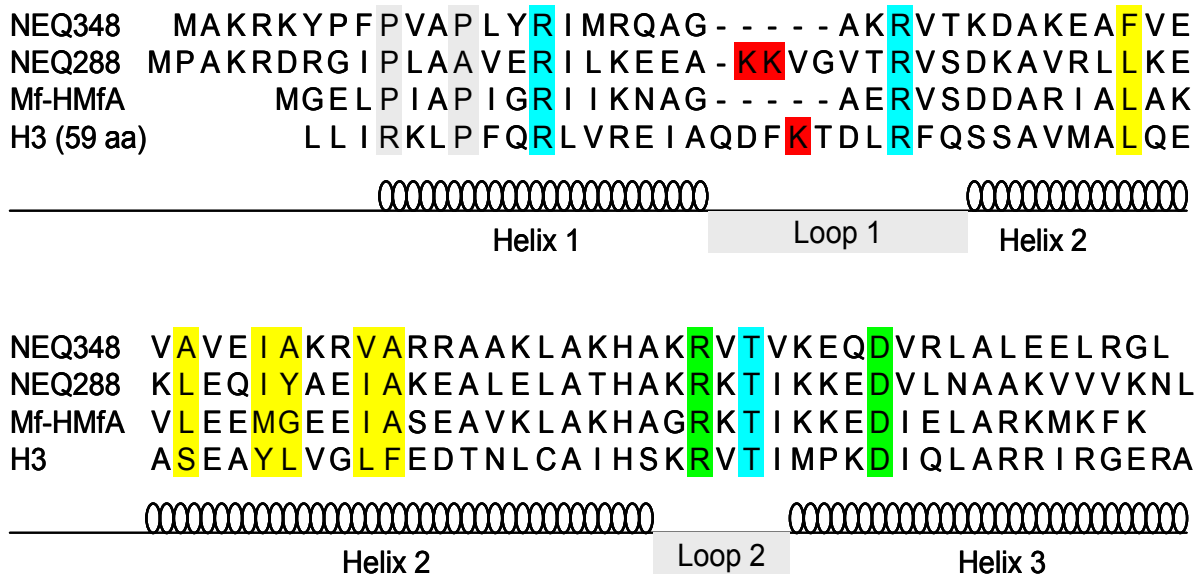
	Aufgereinigte <i>N. equitans</i> - Zellen (90 °C)	Cokultur aus <i>N. equitans</i> und <i>I. hospitalis</i> (90 °C)	<b>I. <i>hospita</i> lis</b> (77 °C)	<b>I. <i>hospita</i> lis</b> (90 °C)	<b>I. <i>hospita</i> lis</b> (95 °C)	<b><i>I. hospitalis</i></b> äußere Membran
Archaeol	+	+	+	+	+	+
Monoglycosyl- Archaeol						
- Isomer a	+	+	+	+	+	+
- Isomer b	+	+	+	+	+	+
- Isomer c	+	+	+	+	+	-
Diglycosyl- Archaeol						
- Isomer a	+	+	+	+	+	+
- Isomer b	+	+	+	+	+	+
- Isomer c	++	++	+	+	+	-
Monoglycosyl- Phospho- Archaeol	+	+	+	+	+	+
Triglycosyl- Archaeol						
- isomer a	+	+	+	+	+	+
- isomer b	+	+	+	+	+	+
- isomer c	+	+	+	+	+	-
Tetraglycosyl- Archaeol						
- isomer a	++	++	+++	+++	+++	++
- isomer b	+	+	+	+	+	-
Monoglycosyl- Phospho-GDGT	+	+	+	+	+	-
Diglycosyl- Phospho-GDGT	+	+	+	+	+	-

Die Zucker der intakten Lipide wurden durch saure Hydrolyse abgetrennt und als ihre TMS-Derivate analysiert. Zum Vergleich wurden die TMS-Derivate von Referenzzuckern (Mannose, Glucose, Arabinose, Galaktose, Rhamnose und Xylose) aufgetragen. Die Ergebnisse dieser Analysen entsprechen den Ergebnissen der methodischen Vorversuche (Jahn, 2003): Alle Proben wiesen qualitativ identische Zuckeranteile auf. Die aufgereinigten *N. equitans*-Zellen, die Cokultur und die bei verschiedenen Temperaturen gezüchteten *I. hospitalis*-Zellen, enthielten ca. 95,5 % Mannose und 4,5 % Glucose. Weder Inositol noch andere Polyole wurden in den Hydrolysaten nachgewiesen.

### 3. Histone von *N. equitans*

#### 3.1. Sequenzanalyse der Histongene (Neq288 und Neq348) von *N. equitans*

Im Genom von *N. equitans* wurden zwei Gene (Neq288 und Neq348) annotiert, die mutmaßlich für Histone kodieren. Abb. 21 zeigt ein Alignment der beiden Histone von *N. equitans* mit einem typischen Vertreter der archaeellen Histone (HMfA von *Methanothermobacter fervidus*) und dem eukaryotischen Histon H3 von *Rattus norvegicus*.



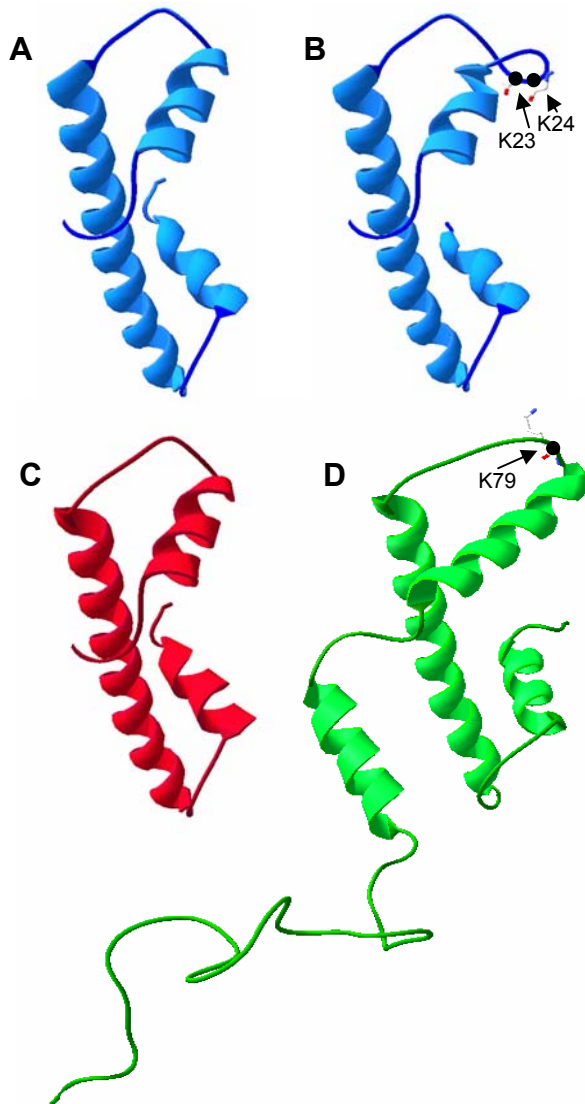
**Abb. 21:** Alignment der Primärsequenzen der Histone von *N. equitans* mit HMfA (aus *Methanothermobacter fervidus*), einem typisch archaeellen Histon, Mitglied der HMf-Familie archaeeller Histone, und dem eukaryotischen Histon H3 (aus *Rattus norvegicus*). Die farbig hinterlegten Aminosäuren kennzeichnen konservierte Bereiche. Aminosäuren, die an die DNA binden, sind türkis markiert. Aminosäuren, die eine Salzbrücke bilden, sind grün markiert. Die mit Spiralen unterlegten Bereiche stellen die drei  $\alpha$ -helicalen Strukturen dar, die durch positiv geladene  $\beta$ -Strand-Loops (Loop 1 und Loop 2) voneinander getrennt sind. Die hydrophoben Reste, die den Dimer-Kern bilden, sind gelb hinterlegt. Die Lysinreste in Loop 1 von H3 und NEQ288 sind rot hervorgehoben.

Ihren Gensequenzen zufolge bestehen die Histone von *N. equitans* aus 82 (NEQ288) bzw. 74 (NEQ348) Aminosäuren. Dies entspricht molekularen Massen von 9170 (NEQ288) bzw. 8540 (NEQ348) Da.

Ihre isoelektrischen Punkte liegen bei pH 10,6 (NEQ288) bzw. pH 11,1 (NEQ348). Im neutralen pH-Bereich (von pH 6-8) weisen beide Histone Nettoladungen von ca. +10 auf, sind also positiv geladen.

In archaeellen Histonen finden sich konservierte Aminosäurereste (R11, R20 und T55 in HMfA), die an der Oberfläche lokalisiert sind und für den Histon-DNA-Kontakt verantwortlich sind. Diese Reste sind in auch den Histonen von *N. equitans* vorhanden (R16, R24 und T59 in NEQ288; R15, R24 und T59 in NEQ348). Konservierte Aminosäurereste (R53 und D60 in HMfA), die in archaeellen Histonen eine Salzbrücke bilden, sind ebenfalls in NEQ288 (R62 und D69) und NEQ348 (R57 und D64) vorhanden. Die meisten archaeellen Histone besitzen nahe des N-Terminus 2 Proline (P5 und P8 in HMfA). In Histondimeren bilden die Proline ein

Prolin-Tetraden-Motiv, welches für die richtige Position der DNA-bindenden Aminosäuren verantwortlich ist (Decanniere et al., 2000). In NEQ348 befinden sich 2 Prolinreste nahe des N-Terminus (P9 und P12), in NEQ288 ist nur ein Prolinrest an dieser Position (P10).



Die mit “SWISS-MODEL“ theoretisch berechnete Tertiärstruktur der Histone von *N. equitans* (Abb. 22 A und B) ist charakteristisch für archaeele Histone (Sandman and Reeve 2000). Sie weist drei  $\alpha$ -Helices auf, die durch kurze, positiv geladene  $\beta$ -Strand-Loops voneinander getrennt sind. Die bei eukaryotischen Histonen üblichen N- und N-terminalen Verlängerungen (Starich et al., 1996, siehe Abb. 22 D) fehlen den Histonen von *N. equitans*. Jedoch zeigt NEQ288 zwei Lysinreste (K23 und K24) in der Linkersequenz Loop L1, zwischen den  $\alpha$ -Helices  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ . Lysinreste in dieser Position wurden bisher nur bei eukaryotischen Histonen, jedoch nicht bei archaeele Histonen gefunden. Sie spielen eine wichtige Rolle bei DNA-Bindung und Kompaktierung (Soares et al., 2003).

**Abb. 22 A,B,C,D:** berechnete Tertiärstrukturen der mutmaßlichen Histone NEQ348 (A) und NEQ288 (B) von *N. equitans* im Vergleich mit bekannten Tertiärstrukturen der Histone HMfA von *Methanothermobacter fervidus* (C) und H3 von *Rattus norvegicus* (D). Die Lysinreste in Loop 1 von NEQ288 und H3 sind durch Pfeile markiert.

### 3.2. Herstellung und Aufreinigung rekombinanter Histone

Die kodierenden Sequenzen für NEQ288 und NEQ348 wurden mittels PCR aus genomischer DNA von *N. equitans* amplifiziert. Dazu wurden Primer konstruiert, die Restriktionsschnittstellen für NdeI (CATATG, direkt vor den Startcodons) und für XhoI (CTCGAG, 23 Nukleotide nach dem Stopcodon bei Neq288, 21 Nukleotide nach dem Stopcodon bei Neq348) einfügten. Nach der Restriktionshydrolyse der PCR-Produkte und des Plasmids pET16b mit NdeI und XhoI wurden die PCR-Fragmente in den Vektor pET16b ligiert. Durch diesen Vektor wurden die histonkodierenden Gene mit einem N-terminalen

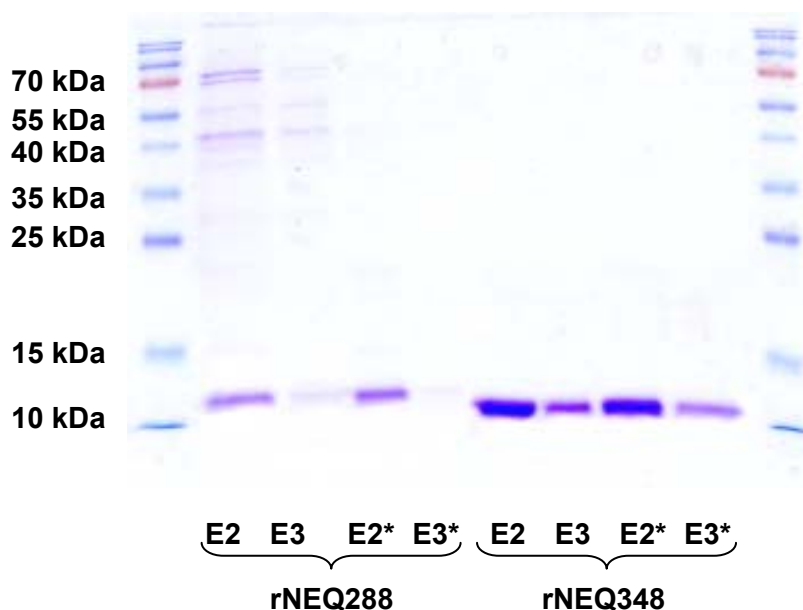


HisTag fusioniert. Dadurch erhöhten sich die Molekulargewichte der rekombinanten Histone um 2,5 kDa. Die Insertionssequenzen wurden zur Kontrolle vollständig sequenziert.

Die konstruierten Expressionsplasmide wurden in verschiedene *E. coli*-Expressionstämme transformiert. Optimale Expression beider rekombinanten Histone wurde mit dem Stamm Rosetta™ bei 37 °C nach 3-stündiger Inkubation erreicht.

Zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine wurde je 1,5 g Zellmasse aufgeschlossen. Nach Abzentrifugation größerer, unlöslicher Zellfragmente wurde zur Aufreinigung von rNEQ348 ein Großteil der *E. coli*-Proteine im Zellextrakt durch einen Hitzeschritt (30 min, 80 °C) gefällt. Bei rNEQ288 konnte dieser Hitzeschritt nicht durchgeführt werden, da es dadurch zu diesem Zeitpunkt denaturiert wurde. Die rekombinanten Proteine wurden über ihren HisTag mittels Affinitätschromatographie an Ni<sup>2+</sup>NTA aufgereinigt. Bei der Elution der Proteine von der Ni<sup>2+</sup>NTA-Säule wurden je vier 0,5 ml Fraktionen (E1, E2, E3, E4) gesammelt. Die Eluatfraktion E1 war zu verunreinigt für den weiteren Gebrauch, in der Fraktion E4 war kaum Protein vorhanden. Durch einen weiteren Hitzeschritt (45 min, 75 °C), der an den Eluat-Fraktionen E2 und E3 durchgeführt wurde, wurden rNEQ288 und rNEQ348 in großer Reinheit erhalten. Die Analyse der Fraktionen erfolgte über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abb. 23). Die rekombinanten Histone rNEQ288 und rNEQ348 sind als Banden mit einer Größe von ca. 11-12 kDa zu erkennen.

Western Blot Analysen mit Anti-HisTag-Antikörpern bestätigten, dass es sich bei diesen Banden um die mit dem HisTag fusionierten, rekombinanten Proteine handelte (Abb. 24).

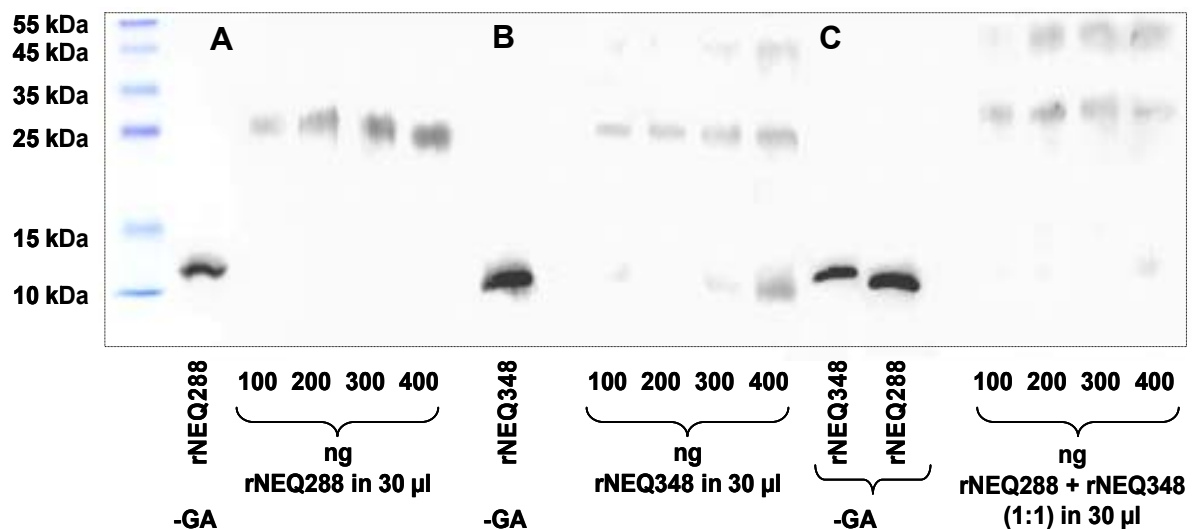


**Abb. 23:** Eluatfraktionen E2 und E3 der rekombinanten Histone rNEQ288 und rNEQ348 nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.  
\* zusätzlicher Hitzeschritt nach der Elution (45 min, 75 °C).

### 3.3. Oligomerisierungsstudien mit rNEQ288 und rNEQ348

Alle nativ gefalteten, funktionellen Histone bilden in Lösung Dimere oder Oligomere höherer Ordnungen (Sullivan et al., 2002). Doch während eukaryotische Histone ausschließlich Heterodimere bilden, können archaeele Histone Homo- und Heterodimere bilden (White und Bell, 2002).

Fraktionen von rNEQ288, rNEQ348 und von äquimolaren Mischungen beider Histone zeigten in Oligomerisierungsstudien (Abb. 24) die Bildung stabiler Dimere. Bei rNEQ288 bildeten sich, unabhängig von der Proteinkonzentration, ausschließlich Dimere mit einer Größe von ca. 25 kDa. Bei rNEQ348 traten neben Dimeren bei steigender Proteinkonzentration auch Tetramere (Komplexe mit einer Molekularmasse von ca. 50 kDa) auf. Beide Histone von *N. equitans* können somit stabile Homodimere bilden, wie alle bekannten archaeele Histone. Die äquimolare Mischung beider rekombinanten Histone zeigte ebenfalls Dimerisierung und Tetramerisierung der Proteine. Ob es sich bei den beobachteten Dimeren in dieser Fraktion um Hetero- oder Homodimere handelt, kann mit der verwendeten Methode nicht geklärt werden. Das vermehrte Auftreten von Tetrameren in der Histonmischung könnte jedoch darauf hindeuten, dass Heterodimere gebildet werden, die eine stärkere Tendenz zur Ausbildung von Tetrameren aufweisen, als Homodimere von NEQ288 oder NEQ348. Auch die folgenden Histon-DNA-Bindungsstudien lassen auf eine Ausbildung von heteromeren Komplexen schließen (siehe 3.4).



**Abb. 24 A,B,C:** Western Blot Analyse von reinen und gemischten Fraktionen der rekombinant hergestellten Histone von *N. equitans*.

Die Proben wurden für 30 min bei 70 °C inkubiert und anschließend mit 0,005 % Glutaraldehyd bei Raumtemperatur für 10 min vernetzt (II.7.2). –GA : Kontrolle ohne Vernetzung mit Glutaraldehyd.

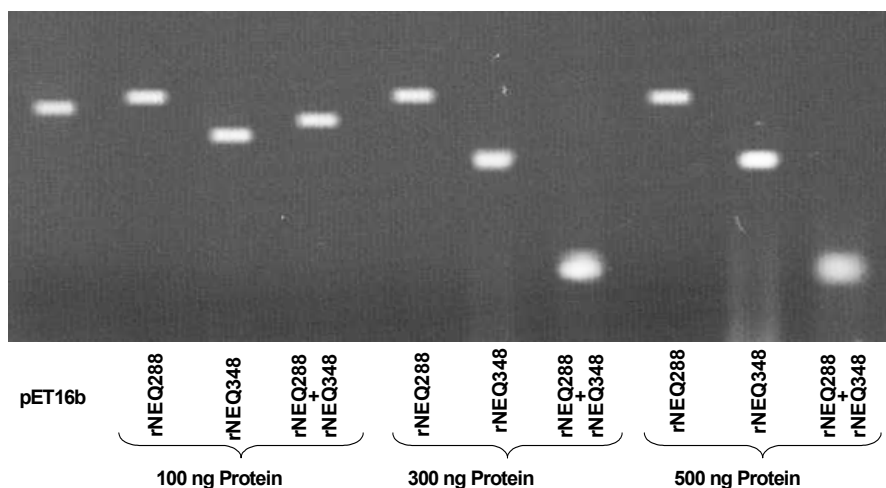
**A:** steigende Mengen von rNEQ288 in 30 µl Ansätzen

**B:** steigende Mengen von rNEQ348 in 30 µl Ansätzen

**C:** äquimolare Mischung steigender Mengen von rNEQ288 und rNEQ348 in 30 µl Ansätzen

### 3.4. DNA-Bindungs- und Kompaktierungsstudien mit rNEQ288 und rNEQ348

Archaeelle Histone können DNA in homo- und heteromeren Mischungen kompaktieren. Eukaryotische Histone können dies nur in Heteromeren Mischungen (White und Bell, 2002). Zur Überprüfung ihrer DNA-Bindungs- und Kompaktierungseigenschaften wurden die Histone von *N. equitans* in homo- und heteromeren Mischungen mit einem linearisierten Plasmid (pET16b) inkubiert. Zuvor wurde der HisTag von den rekombinanten Histonen mit dem Faktor Xa abgespalten. In Abb. 25 wird deutlich, dass die rekombinanten Histone stark unterschiedliche DNA-Bindungs- und Kompaktierungseigenschaften aufwiesen. Die Inkubation mit rNEQ348 führte zu einem Anstieg der elektrophoretischen Mobilität des Plasmids. Dies kann auf die Kompaktierung der DNA durch rNEQ348 zurückgeführt werden. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation von rNEQ288 zu einer Verminderung der elektrophoretischen Mobilität von pET16b. Es scheint, als würde rNEQ288 nicht zu einer Kompaktierung führen, jedoch an das Plasmid binden, und damit eine Erhöhung der Molekularmasse zur Folge haben. Eine äquimolare Mischung beider Histone hatte einen Anstieg der elektrophoretischen Mobilität des Plasmids zur Folge, der stärker war, als bei der gleichen Menge rNEQ348 allein. Anscheinend führen äquimolare Mischungen beider Histone zu einer stärkeren DNA-Kompaktierung als rNEQ348 allein. Ein solches Kompaktierungsverhalten wurde bisher bei keinem archaeellen Histon beobachtet, und ähnelt den Kompaktierungseigenschaften eukaryotischer Histone.

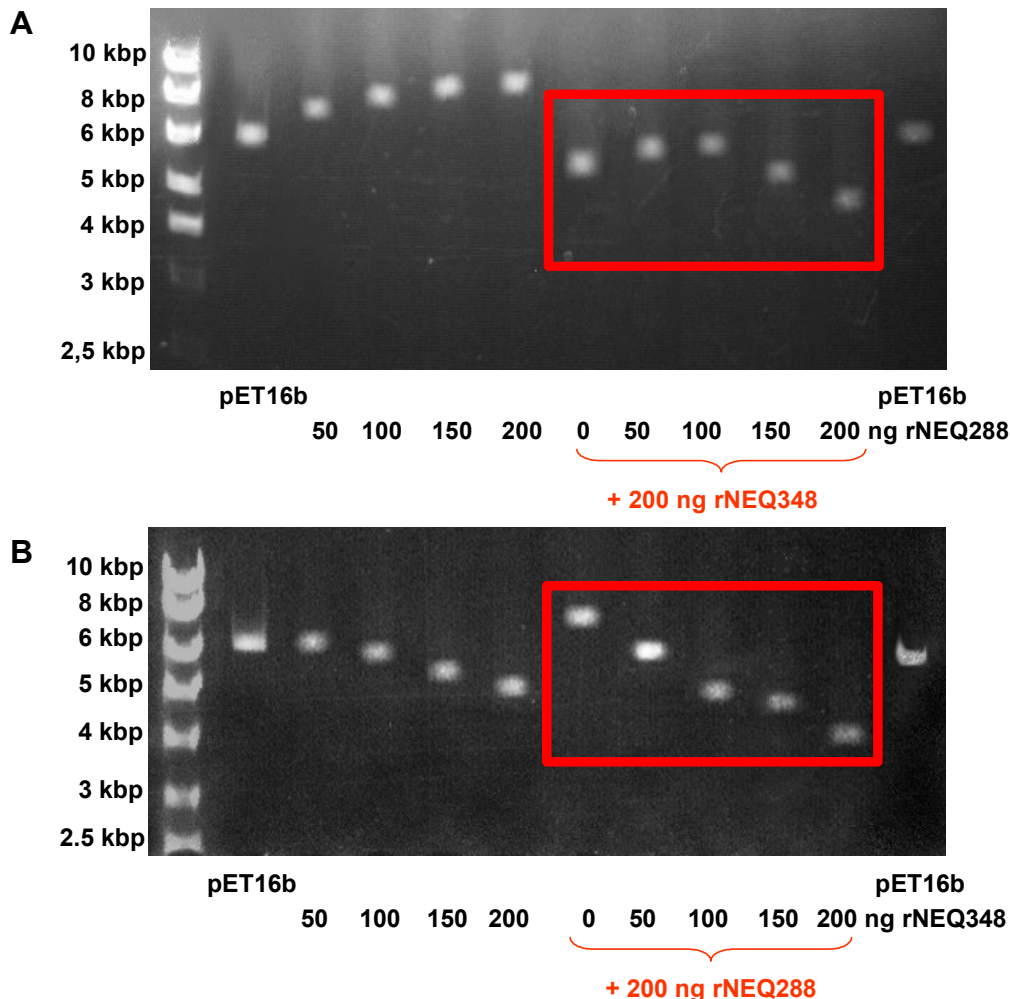


**Abb. 25:** Gelshift-Assay zur Untersuchung der DNA-Kompaktierungseigenschaften von rNEQ288 und rNEQ348. Je 100 ng linearisiertes pET16b-Plasmid (5711 bp) wurde mit 100, 300 oder 500 ng rNEQ288, rNEQ348 oder einer äquimolaren Mischung beider rekombinanten Histone inkubiert. Die Auftrennung erfolgte auf einem 1 %igen Agarose-Gel (inkl.  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  EtBr).

Um zu zeigen, dass die erhöhte DNA-Kompaktierung in heteromeren Histonmischungen eine Folge der Interaktion der beiden Histone ist, wurden Titrationsexperimente durchgeführt. Plasmid-DNA wurde mit steigenden Mengen von rNEQ288 (0, 50, 100, 150, 200 ng), ohne und mit rNEQ348 (200 ng) inkubiert (Abb. 26 A). Ohne rNEQ348 verursachten steigende

Mengen von rNEQ288 eine zunehmende Verringerung der elektrophoretischen Mobilität der Plasmid-DNA. Die kann, wie vorher erwähnt, durch eine Bindung der Histone an die DNA ohne Kompaktierung der DNA erklärt werden. In Gegenwart von rNEQ348 fand bei geringer Menge an rNEQ288 (50 und 100 ng) zunächst eine Verringerung der elektrophoretischen Mobilität der Plasmid-DNA statt. Bei 150 und 200 ng rNEQ288 zeigte sich jedoch ein Anstieg der elektrophoretischen Mobilität der Plasmid-DNA, der stärker war, als für 200 ng rNEQ348 alleine.

In einem weiteren Experiment wurde Plasmid-DNA mit steigenden Mengen rNEQ348 (0, 50, 100, 150, 200 ng), ohne und mit rNEQ288 (200 ng) inkubiert (Abb. 26 B). Steigende Mengen rNEQ348 führten zu einer verstärkten Kompaktierung und somit zu einer zunehmenden elektrophoretischen Mobilität der Plasmid-DNA. Dieser Effekt wurde durch die Gegenwart von rNEQ288 deutlich verstärkt. Dies spricht dafür, dass tatsächlich eine Interaktion der beiden Histone die verstärkte Kompaktierung von DNA zur Folge hat.



**Abb. 26 A,B:** Gelshift-Assay zur Untersuchung der DNA-Kompaktierungseigenschaften von rNEQ288 und rNEQ348. Die Auftrennung erfolgte auf einem 1 %igen Agarose-Gel (inkl.  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  EtBr).  
**A:** Je 100 ng linearisiertes pET16b-Plasmid (5711 bp) wurde mit steigenden Mengen (0, 50, 100, 150, 200 ng) von rNEQ348, separat oder in Gegenwart von 200 ng rNEQ288 (200 ng), inkubiert.  
**B:** Je 100 ng linearisiertes pET16b-Plasmid (5711 bp) wurde mit steigenden Mengen (0, 50, 100, 150, 200 ng) von rNEQ288, separat oder in Gegenwart von 200 ng rNEQ348 (200 ng), inkubiert.

## IV. Diskussion

Die Cokultur aus *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans* repräsentiert in vielfacher Hinsicht ein einzigartiges Organismensystem. In dieser Arbeit wurden bislang unbekannte physiologische, biochemische und molekularbiologische Besonderheiten der beiden Organismen aufgezeigt.

### 1. Stoffwechselwege in *I. hospitalis*

Die Stoffwechselwege in *I. hospitalis* wurden durch eine Kombination aus enzymatischen Analysen, Genomanalysen und Isotopenmarkierungsstudien untersucht. Es wurden Erkenntnisse zu CO<sub>2</sub>-Fixierung, Biosynthese und Abbau von Zuckern, sowie zu Aminosäurebiosynthesewegen gewonnen.

**Suche nach bekannten CO<sub>2</sub>-Fixierungswegen in *I. hospitalis*:** Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass *I. hospitalis* keinen der bekannten CO<sub>2</sub>-Fixierungswege nutzt. Die Schlüsselenzyme dieser Wege waren in Enzymtests mit Zellextrakten von *I. hospitalis* nicht aktiv, und auch die entsprechenden Gene konnten im Genom nicht gefunden werden. Die erhaltenen Daten aus dem <sup>13</sup>C-Markierungsexperiment sprechen ebenfalls gegen eine Verwendung bekannter CO<sub>2</sub>-Fixierungswege.

**CO<sub>2</sub>-Fixierungsreaktionen in *I. hospitalis*:** In Zellextrakten von *I. hospitalis* wurden die Aktivitäten von zwei CO<sub>2</sub>-fixierenden Enzymen nachgewiesen. Dabei handelte es sich um die Aktivitäten der Pyruvat:Akzeptor-Oxidoreduktase und der PEP-Carboxylase. Auch die entsprechenden Gene für diese Enzyme wurden im Genom gefunden. Die Sequenz des mutmaßlichen PEP-Carboxylase-Gens zeigte, dass es sich dabei um die archaeenspezifische PEP-Carboxylase (Patel et al., 2004) handelt. Archaeenspezifische PEP-Carboxylasen weichen bezüglich ihrer Aminosäuresequenz, ihres um 50 % geringeren Molekulargewichts und ihrer katalytischen und regulatorischen Eigenschaften von den bakteriellen und eukaryotischen PEP-Carboxylasen ab. Sequenzähnlichkeiten im katalytischen Zentrum der PEP-Carboxylasen aller drei Domänen lassen jedoch auf eine phylogenetische Verwandtschaft aller PEP-Carboxylasen schließen.

Die für wachsende *I. hospitalis*-Zellen theoretisch berechnete, erforderliche spezifische Aktivität CO<sub>2</sub>-fixierender Enzyme betrug ca. 400 nmol (fixiertes CO<sub>2</sub>) min<sup>-1</sup> (mg Protein)<sup>-1</sup> bei der optimalen Wachstumstemperatur 90 °C. Wenn der neuartige CO<sub>2</sub>-Fixierungsweg über zwei CO<sub>2</sub>-Fixierungsschritte verfügt, sollten die beteiligten Enzyme jeweils mit einer spezifischen Aktivität von ca. 200 nmol min<sup>-1</sup> (mg Protein)<sup>-1</sup> arbeiten. Die bei 85 °C bestimmten Aktivitäten der beiden in *I. hospitalis* gefundenen CO<sub>2</sub>-fixierenden Enzyme betragen ca. 150 nmol min<sup>-1</sup> (mg Protein)<sup>-1</sup> (Pyruvat:Akzeptor-Oxidoreduktase) und ca. 200 nmol min<sup>-1</sup> (mg Protein)<sup>-1</sup> (PEP-Carboxylase). Die gemessenen Aktivitäten stimmen also in

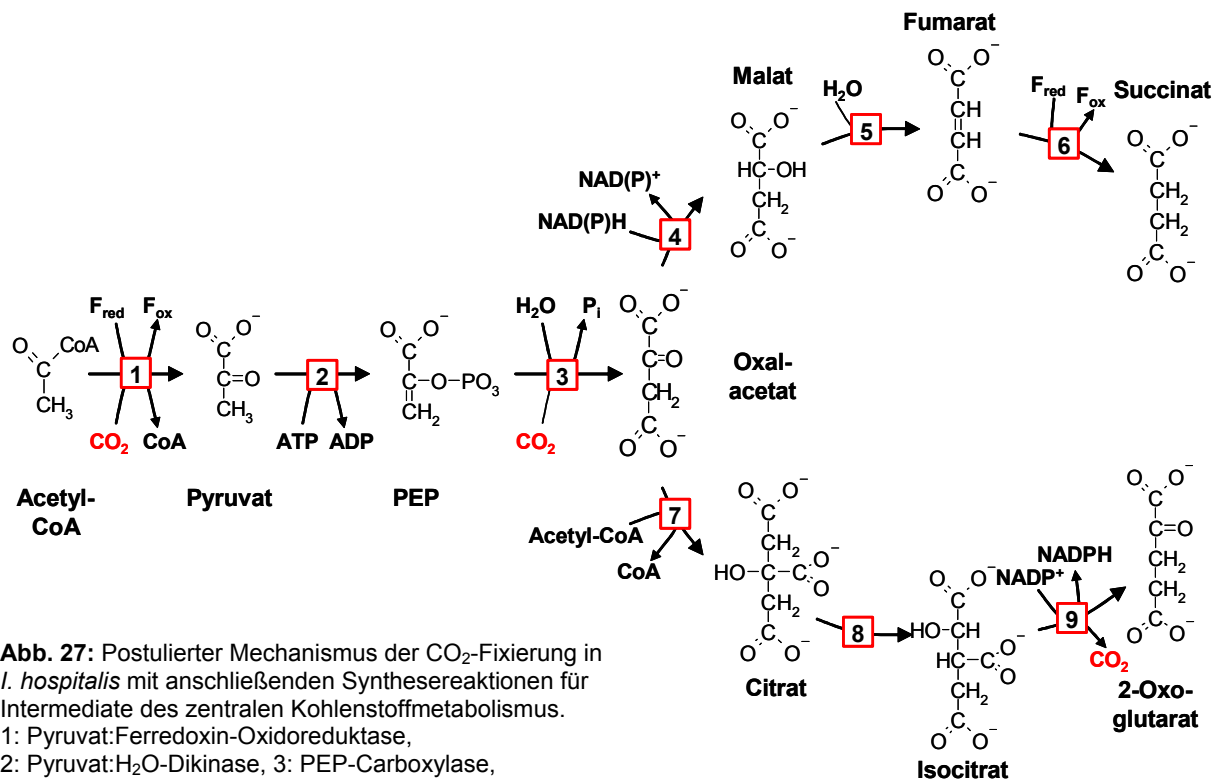
etwa mit den vorher errechneten, erforderlichen Aktivitäten überein. Dazu sollte vermerkt werden, dass die Enzymtests bei 85 °C und unter nicht optimierten Bedingungen durchgeführt wurden. Die Aktivität der Pyruvat:Akzeptor-Oxidoreduktase wurde zudem nur in Richtung der Decarboxylierung des Pyruvats mit einem artifiziellen Elektronenakzeptor (Methylviologen), oder über eine Isotopenaustauschreaktion der Carboxylgruppe ohne zusätzlichen Elektronenakzeptor bestimmt. In wachsenden Zellen könnte die Reduktion des Elektronenakzeptors durch ATP-getriebenen Elektronentransport von NAD(P)H angetrieben werden. Dies würde die Effektivität der reduktiven Carboxylierung von Acetyl-CoA erhöhen (Hedderich, 2004). All diese Faktoren bieten eine Erklärung für die etwas geringere Aktivität der Pyruvat:Akzeptor-Oxidoreduktase.

Durch das Markierungsexperiment mit [1-<sup>13</sup>C]Acetat wurden die Ergebnisse der enzymatischen Analysen und der Genomanalysen bestätigt. Es wurde eindeutig gezeigt, dass eine Carboxylierung des markierten [1-<sup>13</sup>C]Acetats stattfindet. Die nach den Enzymtests vermutete Synthese von Oxalacetat aus Pyruvat (über die Carboxylierung von PEP) konnte durch die <sup>13</sup>C-Markierungsanalysen ebenfalls bestätigt werden.

**Anzeichen für einen unvollständigen Citrat-Zyklus:** Die Enzymtests lassen auf einen unvollständigen Citrat-Zyklus in *I. hospitalis* schließen, dem eine 2-Oxoglutarat:Akzeptor-Oxidoreduktase fehlt. Dementsprechend würde die Synthese des 2-Oxoglutarats durch eine Decarboxylierung von Isocitrat erfolgen und nicht über eine Carboxylierung von Succinyl-CoA. Die erhaltene <sup>13</sup>C-Markierung für 2-Oxoglutarat bestätigte die Ergebnisse der Enzymtests: Das <sup>13</sup>C-Markierungsmuster weist auf eine Synthese von 2-Oxoglutarat über eine Decarboxylierung von Isocitrat hin. Es ist nicht mit einer Synthese von 2-Oxoglutarat über die Decarboxylierung von Succinyl-CoA in Einklang zu bringen. Die beteiligte Citrat-Synthase wies statt der üblichen (si)-Spezifität (EC 2.3.3.1) eine (re)-Spezifität (EC 2.3.3.3) auf. Eine (re)-spezifische Citrat-Synthase wurde bisher nur in Bacteria der Gattungen *Desulfovibrio* (*D. vulgaris* und *D. desulfuricans*) und *Clostridium* (*C. kluyveri*, *C. aciduridi* und *C. cylindrosporum*) gefunden (Gottschalk, 1968, 1969; Gottschalk und Barker, 1966, 1967). In der Domäne der Archaea ist dieses Enzym bislang nicht nachgewiesen worden. Im Genom von *I. hospitalis* wurde weder eine (si)- noch eine (re)-spezifische Citrat-Synthase annotiert. Es stehen jedoch verschiedene Gene, die eine Ähnlichkeit zu Isopropylmalat-Synthase-Genen haben, im Verdacht, für dieses Enzym zu kodieren. Diese Gene werden zurzeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Fuchs in Freiburg exprimiert und auf ihre Funktion hin analysiert.

**Ein neuartiger CO<sub>2</sub>-Fixierungsweg in *I. hospitalis*:** Anhand der übereinstimmenden Ergebnisse von enzymatischen Analysen, Genomanalysen und Isotopenmarkierungsstudien kann für *I. hospitalis* ein neuartiger CO<sub>2</sub>-Fixierungsweg vorgeschlagen werden. In Abb. 27 sind die bekannten Reaktionen dieses Weges dargestellt. Im ersten CO<sub>2</sub>-Fixierungsschritt wird Acetyl-CoA über die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (Pyruvat-Synthase, EC 1.2.7.1) reduktiv zu Pyruvat carboxyliert. Pyruvat wird über die Pyruvat:H<sub>2</sub>O-Dikinase (PEP-Synthase, EC 2.7.9.2) in PEP überführt. Der zweite CO<sub>2</sub>-Fixierungsschritt wird von der PEP-Carboxylase ausgeführt (EC 4.1.1.31) und führt zur Synthese von Oxalacetat aus PEP. Oxalacetat mündet in einen unvollständigen Citrat-Zyklus, dem eine 2-Oxoglutarat:Akzeptor-Oxidoreduktase bzw. -Dehydrogenase fehlt.

Die Regeneration/Synthese des primären CO<sub>2</sub>-Akzeptors Acetyl-CoA konnte bisher nicht geklärt werden. Weder enzymatische noch genomische Analysen ergaben hierfür einen Anhaltspunkt. Die <sup>13</sup>C-Markierungen der Aminosäuren von *I. hospitalis* nach Kultivierung auf [1-<sup>13</sup>C]Acetat zeigten, dass in *I. hospitalis* keine Anreicherung von <sup>13</sup>C am C2-Atom des Acetats stattgefunden hatte; die retrobiosynthetisch ermittelte Position C2 des Acetats war im Gegensatz zur stark markierten C1-Position nur sehr schwach <sup>13</sup>C-markiert. Eine Erklärung hierfür wäre, dass während der Kultivierung von *I. hospitalis* auf Acetat die Bildung von Acetyl-CoA aus anderen Intermediaten nur in sehr geringem Maße stattfand, und vorwiegend [1-<sup>13</sup>C]-markiertes Acetat aus dem Medium verwendet wurde. Alternativ könnte die Regeneration von Acetyl-CoA in einem zyklischen Prozess eines neuartigen CO<sub>2</sub>-Fixierungsweges erneut zu einer dominanten Markierung an C1 dieses Moleküls führen. Die Regeneration des Acetats könnte aus Substraten des unvollständigen Citrat-Zyklus erfolgen. Der Zweig, der zur Synthese von Citrat, Isocitrat und 2-Oxoglutarat führt, dient wahrscheinlich nur anabolen Zwecken. Dies lassen zum einen die geringen Enzymaktivitäten der beteiligten Reaktionen vermuten, zum anderen wird zur Synthese von Citrat Acetyl-CoA mit Oxalacetat kondensiert, was eine anschließende Regeneration von Acetat aus einem der Produkte unwahrscheinlich macht. Verschiedene andere Mechanismen, die zur Regeneration von Acetyl-CoA aus einer der C4-Dicarbonsäuren führen könnten, werden zurzeit überprüft. Konkrete Hinweise hierzu wurden jedoch noch nicht erhalten. Eine Malyl-CoA-Lyase, die zur Regeneration von Acetyl-CoA über die Spaltung von Malyl-CoA führen könnte, wurde weder in enzymatischen Tests, noch im Genom detektiert. Durch die <sup>13</sup>C-Markierungsergebnisse kann aber auch eine *de novo* Synthese von Acetat aus zwei Molekülen CO<sub>2</sub> über einen bisher unbekannten Mechanismus, trotz dagegen sprechender Enzymtests, nicht gänzlich ausgeschlossen werden.



**Abb. 27:** Postulierter Mechanismus der CO<sub>2</sub>-Fixierung in *I. hospitalis* mit anschließenden Synthesereaktionen für Intermediate des zentralen Kohlenstoffmetabolismus.  
 1: Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase,  
 2: Pyruvat:H<sub>2</sub>O-Dikinase, 3: PEP-Carboxylase,  
 4: Malat-Dehydrogenase, 5: Fumarat-Hydratase,  
 6: Fumarat-Reduktase, 7: Citrat-Synthase (re)-spezifisch,  
 8: Aconitase, 9: Isocitrat-Dehydrogenase

**Ähnlichkeiten zu anderen Stoffwechselwegen:** Der hier dargestellte Weg zur CO<sub>2</sub>-Fixierung ähnelt dem Acetat-Assimilierungs-Weg verschiedener anaerober Mikroorganismen. Dazu zählen die methanogenen Archaea *Methanosarcina barkeri* (Weimer und Zeikus, 1979) und *Methanobacterium thermoautotrophicum* (umbenannt in *Methanothermobacter thermoautotrophicus*), sowie einige anaerobe Bacteria wie *Clostridium kluyveri* (Stern und Bambers, 1966; Fuchs und Stupperich, 1980; Tersteegen et al., 1997). In Methanogenen findet jedoch eine *de novo* Synthese des Acetats über den reduktiven Acetyl-CoA-Weg statt, der für *I. hospitalis* ausgeschlossen werden konnte. Daneben finden sich Unterschiede in den beteiligten Enzymen: Die Pyruvat-Synthase (zur reduktiven Carboxylierung von Acetyl-CoA) methanogener Archaea ist gekoppelt an den Cofaktor F<sub>420</sub>, wohingegen Genomanalysen bei *I. hospitalis* auf Ferredoxin als Elektronenüberträger hinweisen. 2-Oxoglutarat wird in *Methanosarcina barkeri* wie bei *I. hospitalis* über Citrat und anschließende Decarboxylierung von Isocitrat synthetisiert. Die beteiligte Citrat-Synthase weist jedoch in *Methanosarcina barkeri* eine (si)-Spezifität auf. In *Methanothermobacter thermoautotrophicus* erfolgt die Synthese des 2-Oxoglutarats durch eine Carboxylierung von Succinyl-CoA. Dies konnte für *I. hospitalis* ausgeschlossen werden. Unter den Bacteria wurde ein ähnlicher Weg bisher nur bei heterotrophen/homoacetogenen Vertretern detektiert, die auf diese Weise Acetat assimilieren (Stern und Bambers, 1966; Gottschalk



und Barker, 1967). In *I. hospitalis* zeigen übereinstimmende enzymatische und genomische Analysen, dass dieser Weg auch ohne extern zugeführtes Acetat genutzt wird.

**Verbreitung des neuartigen CO<sub>2</sub>-Fixierungswegs:** Ob ein derartiger Mechanismus zur CO<sub>2</sub>-Fixierung auch von anderen autotrophen Mitgliedern der Desulfurococcales genutzt wird, ist noch zu klären. Ein ähnlicher oder identischer CO<sub>2</sub>-Fixierungsweg ist wahrscheinlich in *I. islandicus* und *I. pacificus* vorhanden. In diesen beiden *Ignicoccus*-Arten (Familie Desulfurococcaceae, Ordnung Desulfurococcales) wurde ebenfalls die Aktivität der Pyruvat:Akzeptor-Oxidoreduktase nachgewiesen, während die Aktivitäten aller anderen Schlüsselenzyme der bekannten CO<sub>2</sub>-Fixierungswege fehlten (Hügler et al., 2003). Auch für *Pyrodictium occultum* und *Pyrolobus fumarii* (aus der Familie Pyrodictiaceae, Ordnung Desulfurococcales) wurden diese Ergebnisse erhalten (Hügler et al., 2003). Außer den enzymatischen Untersuchungen zu Aktivitäten der Schlüsselenzyme der bekannten CO<sub>2</sub>-Fixierungswege wurden an diesen Organismen jedoch noch keine Tests durchgeführt.

**Biosynthese von Kohlenhydraten in *I. hospitalis*:** Die Biosynthese von C6- und C5-Kohlenhydraten konnte durch übereinstimmende Daten aus den enzymatischen Analysen, den Genomanalysen und den <sup>13</sup>C-Markierungsexperimenten zurückverfolgt werden. Die Gluconeogenese scheint in *I. hospitalis* auf dem konventionellen Weg, einem rückwärts gerichteten (modifizierten) Embden-Meyerhoff-Weg (Siebers und Schönheit, 2005), zu verlaufen. Die Aktivitäten aller Schlüsselenzyme der Gluconeogenese wurden über enzymatische Tests in Zellextrakten von *I. hospitalis* detektiert. Auch wurden fast alle mutmaßlichen Gene für die entsprechenden Enzyme im Genom von *I. hospitalis* annotiert. Ein Gen für die Fructose-1,6-Bisphosphatase wurde vom DOE Joint Genome Institute nicht detektiert. Nachträgliche Blastanalysen zeigten jedoch ein mutmaßliches Gen für eine archaeenspezifische Fructose-1,6-Bisphosphatase (Rashid et al., 2002; Nishimasu et al., 2004). Diese weist einen ähnlichen katalytischen Mechanismus, aber eine stark abweichende Aminosäuresequenz und Kristallstruktur zu den Fructose-1,6-Bisphosphatasen (Klasse I, II oder III) der Bacteria und Eukarya auf. Lediglich das Gen für eine Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase konnte nicht im Genom entdeckt werden, obwohl die Aktivität dieses Enzyms in Zellextrakten nachgewiesen wurde. Verschiedene Gene stehen im Verdacht, für dieses Enzym zu kodieren, und werden an der Universität Freiburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Fuchs untersucht. Die Glucose-6-Phosphat-Isomerase scheint ein Mitglied der Cupin-Superfamilie (Hansen et al., 2001; Verhees et al., 2001) zu sein. Dieses archaeenspezifische Enzym wurde bisher bei einigen Euryarchaeota gefunden und zeigt keine Verwandtschaft zu den Phosphogluco-Isomerasen der Bacteria oder der Eukarya. In wenigen Bacteria wurde ebenfalls ein Gen für dieses Enzym im Genom gefunden. Man nimmt jedoch an, dass diese es durch lateralen Gentransfer von Archaea erworben haben (Hansen et al., 2005).

Die Biosynthese von Pentosephosphaten erfolgt den  $^{13}\text{C}$ -Markierungen nach über eine Abspaltung des C1-Atoms von Hexosephosphat. Die Genomdaten lassen den Schluss zu, dass dies nicht über den oxidativen Pentosephosphat-Weg, sondern über den Ribulose-Monophosphat-Weg geschieht. Dieser Weg wurde erst vor kurzem aufgrund von Genomanalysen als möglicher Weg der Biosynthese von Pentosephosphaten in Archaea beschrieben (Goenrich et al., 2005, Soderberg et al., 2005, Kato et al., 2006). Bisher wurde er jedoch in keinem Archaeum durch Enzymtests oder Markierungsexperimente bestätigt. In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal in einem Archaeum neben der passenden Genomausstattung auch biochemische Resultate ( $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente) erhalten, die für eine Beteiligung dieses Weges an der Biosynthese von Pentosen sprechen.

**Glycolyse in *I. hospitalis*.** Die bisherigen Forschungsergebnisse lassen den Schluss zu, dass *I. hospitalis* nicht zur Energie- und Kohlenstoffgewinnung über den Abbau von extern zugeführten Zuckern fähig ist. Alle Versuche, ihn mit verschiedensten Zuckern als einzige Kohlenstoffquelle zu kultivieren, scheiterten (Paper et al., 2007). In dieser Arbeit wurde zudem durch die Kultivierung von *I. hospitalis* auf  $^{14}\text{C}$ -markierter Glucose gezeigt, dass *I. hospitalis*-Zellen offensichtlich nicht dazu fähig sind, Glucose aufzunehmen und als Quelle für den Zellkohlenstoff zu nutzen. Im Genom wurden dementsprechend keine Gene für Schlüsselenzyme der glycolytische Wege in Archaea (nach Siebers und Schönheit, 2005) gefunden. Dazu zählen Gene für Enzyme des phosphorylierenden oder nicht-phosphorylierenden Entner-Doudoroff-Wegs, Gene für Schlüsselenzyme des glycolytischen Embden-Meyerhoff-Wegs, sowie Gene für eine Pyruvat-Kinase und eine Pyruvat-Dehydrogenase. Im Einklang mit den Genomdaten wurden keine Aktivitäten der Pyruvat-Kinase oder der Pyruvat-Dehydrogenase in Zellextrakten von *I. hospitalis* gefunden, wohingegen die Schlüsselenzyme der Gluconeogenese aktiv waren.

**Biosynthesewege von Aminosäuren:** Die Ergebnisse der  $^{13}\text{C}$ -Markierungen zeigten, dass die Biosynthese der meisten Aminosäuren in *I. hospitalis* über die bekannten, konventionellen Wege verläuft. Durch die Kombination aus Genomanalysen und  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimenten konnten aber auch Biosynthesewege von Aminosäuren aufgeklärt werden, für die es alternative oder ungewöhnliche Synthesewege gibt.

Für die Biosynthese aromatischer Aminosäuren wird von *I. hospitalis* wahrscheinlich der konventionelle Shikimat-Weg und nicht der erst kürzlich beschriebene Aspartat-Semialdehyd-Weg verwendet. Die Markierungsmuster aromatischer Aminosäuren nach der Kultivierung auf  $[1-^{13}\text{C}]$ Acetat wären für beide Biosynthesewege identisch und stimmen mit dem erhaltenen Markierungsmuster überein. Eine leicht erhöhte Markierung an den Kohlenstoffatomen C6/8 des Orthoringssystems in Tyrosin ließ zunächst die Vermutung zu,

dass der Aspartat-Semialdehyd-Weg verwendet wird, der für verschiedene Mitglieder der Euryarchaeota vorgeschlagen wurde (White, 2004; Soderberg, 2005). Die Genomdaten weisen jedoch eindeutig darauf hin, dass in *I. hospitalis* der konventionelle Shikimat-Weg verwendet wird. Dieser wurde auf genomischer Ebene auch für andere Mitglieder der Crenarchaeota vorgeschlagen (Soderberg, 2005).

Anders verhielt es sich mit der Biosynthese von Lysin. Hier wurde im Genom ein Gen des Diaminopimelat-Wegs gefunden. Die  $^{13}\text{C}$ -Markierung von Lysin jedoch zeigte eindeutig, dass dessen Synthese nicht über den konventionellen Diaminopimelat-Weg verlaufen sein kann. Das Markierungsmuster stimmt mit einer Synthese über den relativ unüblichen 2-Aminoadipat-Weg überein. Dieser Weg wurde in höher entwickelten Pilzen (Bhattacharjee, 1985) entdeckt. Inzwischen wurde er auch in Bacteria der Gattung *Thermus* (Zabriskie und Jackson, 2000) und im Crenarchaeum *Thermoproteus neutrophilus* (Schäfer et al., 1989) nachgewiesen.

Auf die Biosynthese von Isoleucin lieferte die Genomanalyse keinen Hinweis. Die erhaltene  $^{13}\text{C}$ -Markierung des Isoleucins aus *I. hospitalis* kann nicht durch die Synthese über 2-Oxobutyrat aus Threonin im konventionellen Biosyntheseweg entstanden sein. Hingegen stimmt es mit der Synthese von Isoleucin über 2-Oxobutyrat aus Acetyl-CoA und Pyruvat im unkonventionellen Citramalat-Weg überein. Dieser Weg wurde bisher nur in der bakteriellen Gattung *Leptospira* (Charon et al., 1974), aber auch in bestimmten Archaea - methanogene Archaea (Eikmanns et al., 1983; Ekiel et al., 1984; Howell et al., 1999) und *Thermoproteus neutrophilus* (Schäfer et al., 1989) - gefunden.

**Herkunft organischer Komponenten in *N. equitans*:** Die Ergebnisse der  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente ermöglichten es,  $^{13}\text{C}$ -Markierungen durch Zufuhr des Substrats  $[1-^{13}\text{C}]\text{Acetat}$  an der Cokultur aus *I. hospitalis* und *N. equitans* durchzuführen. Diese Arbeiten wurden von Martin Gallenberger, Diplomand am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg, durchgeführt. Die Markierungsmuster der Aminosäuren aus den aufgereinigten *N. equitans*-Zellen und den restlichen Zellen der Cokultur (Mischung aus *N. equitans* und *I. hospitalis*) wurden mit den in dieser Arbeit erhaltenen Aminosäure-Markierungsmustern der Reinkultur von *I. hospitalis* verglichen. Es zeigte sich, dass alle drei Proben identische  $^{13}\text{C}$ -Markierungsmuster aufwiesen. Dies lässt darauf schließen, dass *N. equitans* selbst keine Aminosäuren synthetisiert, sondern sie von seinem Wirt *I. hospitalis* erhält.

## 2. Analyse der Membranlipide von *I. hospitalis* und *N. equitans*

**Lipidzusammensetzung der Membranen von *I. hospitalis* und *N. equitans*:** Die Analyse der von den Etherlipiden abgespaltenen Kohlenwasserstoffe und Zucker erfolgte mittels GC-MS. In allen Lipidfraktionen wurden ca. 90 % Phytan und ca. 10 % Biphytan detektiert. Als dominierender Zucker wurde Mannose mit 95,5 % nachgewiesen, Glucose bildete die restlichen 4,5 %. Andere Zucker wurden nicht gefunden. Um die Struktur der intakten polaren Lipide aufzuklären, wurden LC-MS und MS<sup>n</sup>-Analysen an den Lipidfraktionen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen standen dabei im Einklang mit den Ergebnissen der GC-MS-Analyse der Kohlenwasserstoffketten und der Zucker. In den Membranen wurden Archaeol (aus einem Molekül Glycerin und zwei Molekülen Phytan) und Caldarchaeol (Glycerin-Dibiphytan-Glycerin-Tetraether, aus zwei Molekülen Glycerin und zwei Molekülen Biphytan) nachgewiesen. Diese Kernlipide sind als Hauptbestandteil der Membran bei den meisten Archaea zu finden (Kates, 1993). In *I. hospitalis* waren die Kernlipide größtenteils glycosyliert, jedoch wurden auch Phosphoglycolipide gefunden. Die Ionisierung zum Nachweis der intakten, polaren Lipide verlief bei den unterschiedlichen Lipidklassen mit unterschiedlicher Effizienz. Dadurch war bei den LC-MS-Analysen im Gegensatz zu den GC-MS-Analysen keine genaue Quantifizierung möglich. Im Einklang mit den GC-MS-Analysen bildeten jedoch bei den LC-MS-Analysen in allen untersuchten Proben Glycolipide mit einem Archaeolkern den größten Anteil an intakten, polaren Lipiden. Dazu wurden kleine Mengen an n-Glycosyl-Phospho-Archaeol und n-Glycosyl-Phospho-Caldarchaeol gefunden. Die Art der Glycosyluntereinheiten konnte über LC-MS nicht bestimmt werden. Es wurde lediglich gezeigt, dass es sich dabei um Hexosen handeln muss. Dieses Ergebnis stimmt ebenfalls mit der GC-MS-Analyse der Zucker überein.

In den LC-MS-Analysen wurden von einigen intakten, polaren Lipiden mehrere Isomere identifiziert. Diese Lipidisomere wiesen unterschiedliche Retentionszeiten auf, hatten aber die gleichen Fragmentierungsmuster in der Massenspektrometrie. Die Isomerie könnte durch die Verknüpfung der Kernlipide mit unterschiedlichen Hexosen (Mannose oder Glucose) entstanden sein. Aber auch andere Formen von Isomerie kämen als Erklärung in Frage.

Zur Absicherung wurden vergleichende LC-MS und MS<sup>n</sup>-Untersuchungen an Lipidfraktionen thermophiler Archaea, die eine schon bekannte Lipidzusammensetzung aus Glycosyl- und Phospho-Archaeol und Caldarchaeol besitzen (Sturt et al., 2004), durchgeführt. Dazu zählen *Methanocaldococcus jannaschii*, *Sulfolobus shibatae* und *Methanopyrus kandleri*. Die Membranen von *Methanocaldococcus jannaschii* enthalten neben Archaeol und Caldarchaeol auch eine macrozyklische Version des Archaeols. Die polaren Kopfgruppen bestehen hauptsächlich aus Glycerin, das an Phosphat oder verschiedenste Zucker geknüpft ist. Phosphoglycerin bildet dabei den größten Anteil. Statt der auf Glycerin basierenden Kopfgruppen wurden auch Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylserin gefunden

(Ferrante et al. 1990, Sprott et al. 1991). Die Membranen von *Sulfolobus shibatae* weisen eine homogenere Lipidzusammensetzung als die von *Methanocaldococcus jannaschii* auf. Sie bestehen aus Tetraether-Lipiden (Caldarchaeol), die mit Zuckerresten verknüpft sind. Die Lipide der Ordnung Sulfolobales wurden im Detail analysiert (Sugai et al., 1995), da sie ein neuartiges Derivat des Caldarchaeols enthalten, das nur in dieser Ordnung vorkommt. In den Membranen von *Methanopyrus kandleri* sind ausschließlich Diether-Lipide (Archaeol) zu finden, deren Kopfgruppen vorwiegend aus Glycosylglycerin bestehen. Zusätzlich wurden Kopfgruppen aus Phosphoethanolamin, Phosphoglycerin und Phosphocholin detektiert (Sprott et al., 1997). Im Vergleich mit den eben beschriebenen Membranen thermophiler Archaea weisen die Membranen von *I. hospitalis* und *N. equitans* eine einfache Lipidzusammensetzung auf.

**Herkunft der Membranlipide von *N. equitans*:** Es wurden die Lipide einer *I. hospitalis*-Reinkultur, einer aufgereinigten *N. equitans*-Fraktion (Kontamination durch *I. hospitalis*-Zellen ca. 0,01 %) und den aus dieser Kultur erhaltenen Restzellen (Mischung aus *I. hospitalis* und *N. equitans*, ca. 1:10) verglichen.

Die Lipidzusammensetzung der Membranen von *I. hospitalis* und *N. equitans* war qualitativ identisch. Lediglich die prozentualen Anteile bestimmter Komponenten variierten. So war in den Kohlenwasserstoffen der *N. equitans*-Fraktion nur die Hälfte an Biphytan (ca. 10 %) wie in den *I. hospitalis*-Zellen (ca. 20 %) vorhanden. Auch die detektierten intakten polaren Lipide wiesen unterschiedliche prozentuale Anteile auf. Die von den Lipiden abgespaltenen Zucker von *N. equitans* und *I. hospitalis* waren qualitativ und quantitativ identisch.

Die Isotopenanalysen der Kohlenwasserstoffe ergaben für die aufgereinigten *N. equitans*-Zellen dieselben  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte wie für die restlichen Zellen der abzentrifugierten Cokultur. Beide Proben wiesen für Phytan und Biphytan  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von ca. -16 ‰ relativ zum internationalen Standard VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite) auf. Dies spricht für einen identischen Biosyntheseweg dieser Kohlenwasserstoffe. Bei allen anderen Proben, den bei verschiedenen Temperaturen gezüchteten *I. hospitalis*-Reinkulturen, wichen die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte stark voneinander ab. Dies liegt an der Zufuhr von  $\text{CO}_2$  aus mehreren Gasflaschen während der Kultivierung der Zellen (Roger Summons, MIT, Boston, USA). Für die Durchgasung eines Fermenters werden sechs Gasflaschen gekoppelt. Schweres  $^{13}\text{CO}_2$  sinkt in den Gasflaschen nach unten. Somit wird, wenn die Flaschen voll sind, dem Fermenter hauptsächlich  $^{12}\text{CO}_2$  zugeführt. Bei Leerung der Flaschen erhöht sich graduell der Anteil von  $^{13}\text{CO}_2$ . Ein höherer  $^{13}\text{CO}_2$ -Gehalt führt zu einem erhöhten Einbau von  $^{13}\text{C}$  in *I. hospitalis* und somit zu erhöhten  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten.

Erwähnt werden sollte, dass neuere elektronenmikroskopische Untersuchungen auf eine Kontamination der *N. equitans*-Fraktion durch lichtmikroskopisch nicht sichtbare Vesikel oder Membranfetzen von *I. hospitalis* hindeuten. Eine Sequenzierung der prominenten

Proteinbanden dieser Fraktion erbrachte allerdings ausschließlich Proteine von *N. equitans* und keine von *I. hospitalis* (Gürster, 2007). Außerdem wurden in der aufgereinigten *N. equitans*-Fraktion und in den restlichen *I. hospitalis*- und *N. equitans*-Zellen der Cokultur ausschließlich die gleichen Kohlenwasserstoffe, Lipide und Zucker entdeckt wie in der *I. hospitalis*-Reinkultur. Die hier verwendeten Untersuchungsmethoden wären mit einer Detektionsgrenze von  $< 0,1 \%$  sensitiv genug, um auch bei größeren Kontaminationen andersartige Lipide aus *N. equitans*-Zellen zu detektieren. Falls die *N. equitans*-Fraktion tatsächlich durch größere Mengen von *I. hospitalis*-Membranen kontaminiert wäre, würden sich also lediglich quantitative Verschiebungen ergeben.

Im Einklang mit der qualitativ identischen Lipidzusammensetzung der Membranen von *N. equitans* und *I. hospitalis* wurden im Genom von *N. equitans* keine Gene für die Biosynthese von Lipiden (oder anderen Zellbausteinen) identifiziert (Waters et al., 2003). Bedenkt man dazu den großen phylogenetischen Abstand zwischen *N. equitans* und *I. hospitalis* (Huber et al., 2002), kann man folgern, dass *N. equitans* selbst keine Lipide synthetisiert und sie stattdessen von seinem Wirt *I. hospitalis* übernimmt. Auf welche Weise dieser Lipidtransfer stattfindet, ist ungeklärt. An den Kontaktstellen von *I. hospitalis* und *N. equitans* gibt es im Gegensatz zu früheren Vermutungen (Waters et al., 2003) keinen Hinweis für Vesikel-basierenden Transport (Reinhard Rachel, persönliche Mitteilung). Spezifische Lipidtransporter wurden bei keinem der beiden Organismen im Genom annotiert. Quantitative Unterschiede der Lipidzusammensetzung könnten jedoch für eine selektive Lipidaufnahme durch *N. equitans*-Zellen sprechen. Zusätzlich wurden im Genom von *N. equitans* Gene für bestimmte Modifikationsprozesse, wie Glycosylierungen, annotiert (Waters et al., 2003). Es bleibt jedoch fraglich, ob und für welche Modifikationsprozesse diese Gene exprimiert werden.

**Einfluss der Kultivierungstemperatur auf die Zusammensetzung der Membranlipide von *I. hospitalis*:** Es wurde die Zusammensetzung der Membranlipide von *I. hospitalis*-Zellen verglichen, die bei der minimalen (77 °C), der optimalen (90 °C) und der maximalen (95 °C) Wachstumstemperatur kultiviert wurden. GC-MS-Analysen der Kohlenwasserstoffketten und Zucker, sowie LC-MS Analysen der intakten, polaren Lipide zeigten ein qualitativ identisches Lipidmuster. Jedoch wurde in der GC-MS-Analyse ein auffälliger Abfall in der relativen Häufigkeit des Biphytans von ca. 20 % bei der optimalen Wachstumstemperatur zu ca. 10 % bei der minimalen und der maximalen Wachstumstemperatur beobachtet. Andere Archaea wie *Methanocaldococcus jannaschii* erhöhen die Anzahl der Tetraether bei steigender Kultivierungstemperatur (Sprott et al., 1991). Dies wurde darauf zurückgeführt, dass Tetraether aufgrund ihrer Eigenschaft, die zwei Membranschichten zu verbinden, zu erhöhter Membranstabilität führen. Jedoch enthalten die Membranen anderer hyperthermophiler Archaea wie *Methanopyrus kandleri* und *Thermococcus celer* keine Tetraetherlipide in ihren

Membranen (Kurr et al., 1991; De Rosa et al., 1991). Ein Anstieg in der relativen Häufigkeit der stabilen Tetraether ist offensichtlich weder notwendig noch charakteristisch für die Aufrechterhaltung der Membranstabilität bei sehr hohen Temperaturen. Tetraetherlipide werden in Archaea durch eine Verknüpfung der Kohlenwasserstoffe zweier gegenüberliegender Dietherlipide synthetisiert (Koga et al., 1993). Der Mechanismus der Kondensation und die beteiligten Enzyme sind bis jetzt nicht bekannt (Kon et al., 2002; Nemoto et al., 2003). Für *I. hospitalis* erscheint es, als würde das Wachstum bei sub-optimalen Bedingungen die biosynthetischen Prozesse hemmen, die zur Tetraetherbildung führen.

### 3. Histone von *N. equitans*

Die Sequenzen der beiden im Genom von *N. equitans* annotierten Gene Neq288 und Neq348 und die daraus ermittelten Sekundärstrukturen sind charakteristisch für archaeelle Histone. Jedoch ist NEQ288 das einzige archaeelle Histon, das wie eukaryotische Histone (Starich et al., 1996; Soares et al., 2003) ein Lysin in Loop 1 enthält. Um zu überprüfen, ob die Neq288 und Neq348 tatsächlich für funktionelle Histone kodieren, wurden diese in *E. coli* exprimiert und auf ihre Funktionalität hin überprüft.

Das rekombinant hergestellte Histon rNEQ348 verhielt sich dabei wie ein typisch archaeelles Histon (Sandman and Reeve, 2000): Es konnte stabile Homomere bilden und war nicht, wie eukaryotische Histone (Luger and Richmond 1998), nur zur Heterodimerbildung mit einem spezifischen Partner befähigt. Diese Homodimere konnten sich auch zu Tetrameren zusammenlagern. Des Weiteren konnte rNEQ348 DNA in homomeren Komplexen kompaktieren, ohne dabei ein spezifisches anderes Histon zu benötigen.

Das rekombinant hergestellte Histon rNEQ288 wies hingegen Eigenschaften auf, die von denen eines typisch archaeellen Histons abwichen. Zwar konnte rNEQ288 stabile Homodimere bilden, jedoch traten im Gegensatz zu rNEQ348 keine Tetramere auf. Eine Inkubation von rNEQ288 mit DNA führte zu einer Verzögerung der Laufgeschwindigkeit der DNA. Dies lässt darauf schließen, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen Homomere von rNEQ288 zwar an DNA binden, diese jedoch nicht kompaktieren konnten. Erstaunlicherweise führte eine äquimolare Mischung von rNEQ348 und rNEQ288 zu einer Kompaktierung der DNA, die stärker war, als für die gleiche Menge rNEQ348 allein. Dies könnte verschiedene Gründe haben: Zum einen kann die mangelnde Kompaktierungsfähigkeit von rNEQ288 in Abwesenheit von rNEQ348 ein Artefakt der Synthese- bzw. Versuchsbedingungen sein, die nicht dem natürlichen System in *N. equitans* entsprechen. In Gegenwart von rNEQ348 könnte rNEQ288 durch Wechselwirkungen der beiden Histone seine natürlichen Kompaktierungseigenschaften wieder erlangen. Zum Beispiel könnte eine unkorrekte Faltung von rNEQ288 in Heterodimeren mit rNEQ348

korrigiert werden. Um die Versuchsbedingungen zu optimieren, wurden verschiedene Puffersysteme, pH-Werte und Temperaturen getestet, was jedoch entweder zum selben Ergebnis oder zu einer Denaturierung der Proteine führte. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass rNEQ288 tatsächlich eukaryotische DNA-Kompaktierungseigenschaften aufweist. Die DNA-Kompaktierung durch archaeele Histone erfolgt durch Histontetramere, welche in Ihrer Struktur dem Kern des eukaryotischen Nukleosoms, einem Tetramer aus  $(H3+H4)_2$  ähneln (Grayling et al., 1997; Pereira et al., 1997). Diese DNA-kompaktierenden Tetramere können bei archaeeen Histonen aus vier identischen Histonuntereinheiten aufgebaut sein (Sandman et al., 1998). Im Gegensatz dazu können eukaryotische Histone ausschließlich in Heterodimeren mit einem spezifischen Partner DNA-kompaktierende Tetramere ausbilden (Luger and Richmond, 1998). Dies könnte auch auf rNEQ288 zutreffen. Die Fähigkeit zur Ausbildung DNA-kompaktierender Tetramere wäre demnach nur in Gegenwart von rNEQ348 vorhanden. Wäre dies der Fall, würde rNEQ288 Eigenschaften archaeeer und eukaryotischer Histone aufweisen. Weitere Untersuchungen an den Histonen von *N. equitans* könnten in diesem Fall Aufschluss darüber geben, wieso eukaryotische Histone im Gegensatz zu archaeeen nur Heterodimere bilden können, und welche Sequenzsignaturen dafür verantwortlich sind.

In *N. equitans* könnten die unterschiedlichen DNA-Bindungs- und Kompaktierungseigenschaften beider Histone verschiedene Funktionen bei der Genomkompaktierung und der Genregulation reflektieren. Eine derartige Beobachtung wurde bei *Methanothermus fervidus* gemacht (Sandman et al., 1994). Je nach Wachstumsphase wurden unterschiedliche Mengen der beiden Histone (HMfA und HMfB) in *M. fervidus*-Zellen detektiert. In der exponentiellen Phase wurde vorwiegend HMfA nachgewiesen, das DNA schwächer kompaktierte als HMfB. In der stationären Phase nahm der Anteil des stark kompaktierenden Histons HMfB zu. Es wäre jedoch auch möglich, dass in *N. equitans*, wie bei Eukaryota, beide Histone in äquimolaren Mischungen vorliegen, und die DNA-Kompaktierung ausschließlich durch Heterodimere erfolgt.

Mit der Entdeckung funktioneller Histone in *N. equitans* wurden Histone somit in allen bisher bekannten archaeeen Reichen nachgewiesen. Dazu zählen die Euryarchaeota (White und Bell, 2002), die Crenarchaeota (Čubonová et al. 2005) und die Nanoarchaeota (Huber et al., 2002; Waters et al., 2003). Im kürzlich sequenzierten Gesamtgenom eines Vertreters der Korarchaeota, dem vierten Reich der Archaea, wurden ebenfalls mutmaßliche Gene für Histone annotiert (Prof. Stetter, persönliche Mitteilung). Somit wurde ein weiterer Beleg für die Entwicklung der Histone vor der Aufspaltung der archaeeen Reiche und für einen nachträglichen Verlust der Histone in modernen hyperthermophilen Crenarchaeota erhalten.



## V. Zusammenfassung

Biosynthesewege in *I. hospitalis* wurden durch eine Kombination aus drei voneinander unabhängigen Methoden (enzymatische Analysen, Genomanalysen und  $^{13}\text{C}$ -Langzeit-Markierungen von Aminosäuren) untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich *I. hospitalis* eines bisher unbekannten  $\text{CO}_2$ -Fixierungswegs bedient. Der erste  $\text{CO}_2$ -Fixierungsschritt ist offensichtlich die Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Pyruvat, welches zu PEP umgewandelt wird. Den zweiten  $\text{CO}_2$ -Fixierungsschritt stellt die Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat dar. Oxalacetat mündet in einen unvollständigen Citrat-Zyklus, dem die 2-Oxoglutarat: Akzeptor-Oxidoreduktase fehlt. Bisher ungeklärt ist die Regeneration/Synthese des primären  $\text{CO}_2$ -Akzeptors Acetyl-CoA. Ob der unvollständige Citrat-Zyklus an der Regeneration des Acetats beteiligt ist, oder nur anabolen Zwecken dient, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Des Weiteren wurde gezeigt, dass *I. hospitalis* über eine re-spezifische Citrat-Synthase verfügt. Die Gluconeogenese scheint in *I. hospitalis* über einen rückwärts gerichteten (modifizierten) Embden-Meyerhoff-Weg stattzufinden. Die Biosynthese von Pentosephosphaten erfolgt wahrscheinlich über eine Deformylierung von Hexosephosphat, über den Ribulose-Monophosphat-Weg. *I. hospitalis* fehlen vermutlich alle glycolytischen Wege zur Gewinnung von Energie oder Zellbausteinen aus Zuckern. Die Aminosäure-Biosynthesewege verlaufen in *I. hospitalis* für die meisten Aminosäuren über die bekannten, konventionellen Wege. Aromatische Aminosäuren werden über den konventionellen Shikimat-Weg und nicht über den kürzlich beschriebenen Aspartat-Semialdehyd-Weg synthetisiert. Zur Synthese von Lysin wird offensichtlich der 2-Aminoadipatweg genutzt, der bisher nur bei primitiven Eukaryota, Bacteria der Gattung *Thermus* und dem Crenarchaeum *Thermoproteus neutrophilus* entdeckt wurde. Die Synthese von Isoleucin erfolgt den hier gezeigten Ergebnissen nach über den Citramalat-Weg, der bisher ausschließlich in Bacteria der Gattung *Leptospira*, methanogenen Archaea und *Thermoproteus neutrophilus* gefunden wurde.

Die Membranen von *I. hospitalis* und *N. equitans* wurden mittels GC-MS und LC-MS auf ihre Lipidzusammensetzung hin untersucht. Dabei wurden sowohl die Kohlenwasserstoffketten und die Zucker der Lipide (GC-MS), als auch die intakten polaren Lipide (LC-MS) bestimmt. Die Membranen wiesen eine einfache Lipidzusammensetzung aus Glycerin-Diphytan-Diether- und Glycerin-Dibiphytan-Glycerin-Tetraetherlipiden auf, die glycosyliert (mit Mannose oder Glucoseresten) und phosphoryliert sein konnten. Vergleichende Lipidanalysen zeigten, dass *N. equitans* seine Lipide offensichtlich vollständig von seinem Wirt *I. hospitalis* übernimmt. Auf welche Weise dieser Lipidtransfer stattfindet, ist ungeklärt. Spezifische Biomarker wurden für keinen der beiden Organismen detektiert. *I. hospitalis*-Zellen, die bei der minimalen, optimalen und maximalen Wachstumstemperatur gezüchtet wurden, zeigten einen Abfall des Tetraetherlipid-Anteils von der optimalen zur

minimalen/maximalen Wachstumstemperatur. Ein erhöhter Tetraetherlipid-Anteil ist in *I. hospitalis* somit nicht zur Aufrechterhaltung der Membranstabilität bei erhöhten Temperaturen erforderlich.

Die mutmaßlichen Histongene Neq288 und Neq348 von *N. equitans* wurden in *E. coli* exprimiert. Nach Aufreinigung der rekombinanten Histone zeigten Dimerisierungs- und DNA-Kompaktierungsanalysen, dass die Gene für funktionelle Histone kodieren. NEQ288 weist im Gegensatz zu allen anderen archaeeellen Histonen einen Lysinrest in Loop 1 auf, welchem bei eukaryotischen Histonen eine wichtige Rolle bei DNA-Bindung und Kompaktierung zugeschrieben wird. In den hier durchgeführten Tests wies rNEQ288 tatsächlich eher eukaryotische als archaeeelle Kompaktierungseigenschaften auf: rNEQ288 band an DNA, führte jedoch nicht zu einer Kompaktierung. In äquimolaren Mischungen aus rNEQ348 und rNEQ288 fand hingegen eine DNA-Kompaktierung statt die stärker war, als für die gleiche Menge an rNEQ348 allein. Die genauen Ursachen sind Gegenstand weiterer Forschung.

## VI. Literaturverzeichnis

- Achenbach-Richter L., Gupta, R., Zillig, W., Woese, C. R. (1988)** Rooting the archaeobacterial tree: the pivotal role of *Thermococcus celer* in archaeobacterial evolution. *Syst. Appl. Microbiol.* **10**:231-240.
- Alber, B. E., and Fuchs, G. (2002)** Propionyl-coenzyme A synthase from *Chloroflexus aurantiacus*, a key enzyme of the 3-hydroxypropionate cycle for autotrophic CO<sub>2</sub> fixation. *J. Biol. Chem.* **277**:12137-12143.
- Alber, B., Olinger, M., Rieder, A., Kockelkorn, D., Jobst, B., Hügler, M., and Fuchs, G. (2006)** Malonyl-Coenzyme A Reductase in the Modified 3-Hydroxypropionate Cycle for Autotrophic Carbon Fixation in Archaeal *Metallosphaera* and *Sulfolobus* spp. *J. Bacteriol.* **188**:8551-8559.
- Antranikian, G., Herzberg, C., and Gottschalk, G. (1982)** Characterization of ATP citrate lyase from *Chlorobium limicola*. *J. Bacteriol.* **152**(3):1284-1287.
- Arents, G., and Moudrianakis, E. N. (1995)** The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:11170-11174.
- Bacher, A., Rieder, C., Eichinger, D., Arigoni, D., Fuchs, G., and Eisenreich, W. (1999)** Elucidation of novel biosynthetic pathways and metabolic flux pattern by retrobiosynthetic NMR analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**:567-598.
- Bassham, J. A., and Calvin, M. (1962)** The way of CO<sub>2</sub> in plant biosynthesis. *Comp. Biochem. Physiol.* **4**:187-204.
- Beh, M., Strauss, G., Huber, R., Stetter, K. O., and Fuchs, G. (1993)** Enzymes of the reductive citric acid cycle in the autotrophic eubacterium *Aquifex pyrophilus* and in the archaeobacterium *Thermoproteus neutrophilus*. *Arch. Microbiol.* **160**:306-311.
- Bergmeyer, H. U. (1970)** Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim.
- Bhattacharjee, J. K. (1985)** alpha-Aminoadipate pathway for the biosynthesis of lysine in lower eukaryotes. *Crit. Rev. Microbiol.* **12**:131-151.
- Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959)** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**:911-917.
- Bock, A., Prieger-Kraft, A., and Schönheit, P. (1994)** Pyruvate - a novel substrate for growth and methane formation in *Methanosarcina barkeri*. *Arch. Microbiol.* **161**(1):33-46.
- Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Brochier, C., Gribaldo, S., Zivanovic, Y., Confalonieri, F., and Forterre, P. (2005)** Nanoarchaea: representatives of a novel archaeal phylum or a fast evolving euryarchaeal lineage related to Thermococcales? *Genome Biol.* **6**:42
- Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., Blake, J. A., FitzGerald, L. M., Clayton, R. A., Gocayne, J. D., Kerlavage, A. R., Dougherty, B. A., Tomb, J. F., Adams, M. D., Reich, C. I., Overbeek, R., Kirkness, E. F., Weinstock, K. G., Merrick, J. M., Glodek, A., Scott, J. L., Geoghagen, N. S., and Venter, J. C. (1996)**

Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. Science **273**(5278):1058-10573.

**Burghardt, T., Näther, D. J., Junglas, B., Huber, H., and Rachel, R. (2007)** The dominating outer membrane protein of the hyperthermophilic Archaeum *Ignicoccus hospitalis*: a novel pore-forming complex. Mol. Microbiol. **63**(1):166-176.

**Charon, N. W., Johnson, R., and Peterson, D. (1974)** Amino acid biosynthesis in the spirochete *Leptospira*: evidence for a novel pathway of isoleucine biosynthesis. J. Bacteriol. **117**:203-211.

**Choi, J. J., Nam, K. H., Min, B., Kim, S. J., Söll, D., and Kwon, S. T. (2006)** Protein trans-splicing and characterization of a split family B-type DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeal parasite *Nanoarchaeum equitans*. J. Mol. Biol. **356**(5):1093-1106.

**Choquet, C. G., Richards, J. C., and Sprott, G. D. (1994)** Ribose synthesis in methanogenic archaea. Arch. Microbiol. **161**:481-488.

**Ciccarelli, F. D., Doerks, T., von Mering, C., Creevey, C. J., Snel, B., and Bork, P. (2005)** Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. Science **311**:1283-1287.

**Čubonová, L., Sandman, K., Hallam, S. J., DeLong, E. F., and Reeve, J. N. (2005)** Histones in Crenarchaea. J. Bacteriol. **187**:5482-5485.

**Dawson, R. M., Elliot, D. C., Elliot, W. H., and Jones, K. M. (1986)** Data for biochemical research, 3<sup>rd</sup> ed. Clarendon Press, Oxford, United Kingdom.

**Decanniere, K., Babu, A. M., Sandman, K., Reeve, J. N., and Heinemann, U. (2000)** Crystal structures of recombinant histones HMfA and HMfB from the hyperthermophilic archaeon *Methanothermus fervidus*. J. Mol. Biol. **303**:35-47.

**De Rosa, M., and Gambacorta, A. (1988)** Lipid biogenesis in archaebacteria. In: Kandler, O., Zillig, W. (Eds); Archaebacteria, Fischer, Stuttgart.

**DeRosa, M., Gambacorta, A., Huber, R., Lanzotti, V., Nicolaus, B., Stetter, K. O., and Trincone, A. (1988)** A new 15,16-dimethyl-30-glycerolxytriacontanoic acid from lipids of *Thermotoga maritima*. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1300–1301.

**De Rosa, M., Trincone, A., Nicolaus, B., and Gambacorta, A. (1991)** Archaebacteria: Lipids, membrane structures, and adaption to environmental stresses. In: DiPrisco, G. (Ed); Life under extreme conditions, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

**Eden, G., and Fuchs, G. (1983)** Autotrophic CO<sub>2</sub> fixation in *Acetobacterium woodii*. II. Demonstration of enzymes involved. Arch. Microbiol. **135**:68-73.

**Eikmanns, B., Linder, D., and Thauer, R. K. (1983)** Unusual pathway of isoleucine biosynthesis in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Arch. Microbiol. **136**:111-113.

**Eisenreich, W., and Bacher, A. (2000)** Elucidation of biosynthetic pathways by retrodictive/predictive comparison of isotopomer patterns determined by NMR spectroscopy. Genet. Eng. (NY) **22**:121-153.

**Eisenreich, W., Schwarzkopf, B., and Bacher, A. (1991)** Biosynthesis of nucleotides, flavins, and deazaflavins in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. J. Biol. Chem. **266**:9622-9631.

- Ekiel, I., Smith, I. C., and Sprott, G. D. (1983)** Biosynthetic pathways in *Methanospirillum hungatei* as determined by  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance. *J. Bacteriol.* **156**(1):316-326.
- Ekiel, I., Smith, I. C., and Sprott, G. D. (1984)** Biosynthesis of isoleucine in methanogenic bacteria: a  $^{13}\text{C}$  NMR study. *Biochemistry* **23**:1683-1687.
- Evans, M. C. W., Buchanan, B. B., and Arnon, D. I. (1966)** A new, ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **55**:928-934.
- Ezaki, S., Maeda, N., Kishimoto, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (1999)** Presence of a structurally novel type ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. *J. Biol. Chem.* **274**(8):5078-5082.
- Ferrante, G., Richards, J. C., and Sprott, G. D. (1990)** Structures of polar lipids from the thermophilic, deep-sea archaeobacterium *Methanococcus jannaschii*. *Biochem Cell Biol.* **68**(1):274-283.
- Fuchs, G. (1986)**  $\text{CO}_2$  fixation in acetogenic bacteria: variations on a theme. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**:181-213.
- Fuchs, G. (2006)** Biosynthesen. In: Fuchs, G. (Ed); *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Fuchs, G., Stupperich, E., and Eden, G. (1980)** Autotrophic  $\text{CO}_2$  fixation in *Chlorobium limicola*. Evidence for the operation of a reductive tricarboxylic acid cycle in growing cells. *Arch. Microbiol.* **128**:64-71.
- Fuchs, G., and Stupperich, E. (1980)** Acetyl-CoA, a central intermediate of autotrophic  $\text{CO}_2$  fixation in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Microbiol.* **127**:267-272.
- Gaasterland, T., and Ragan, M. A. (1998)** Microbial genescapes: phyletic and functional patterns of ORF distribution among prokaryotes. *Microb. Comp. Genomics* **3**(4):199-217.
- Gallagher, S., Winston, S. E., Fuller, S. A., and Hurrell, J. G. R. (1997)** Immunoblotting and Immunodetection. In: Ausubel, F. M. (Ed); *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Goenrich, M., Thauer, R. K., Yurimoto, H., and Kato, N. (2005)** Formaldehyde activating enzyme (Fae) and hexulose-6-phosphate synthase (Hps) in *Methanosarcina barkeri*: a possible function in ribose-5-phosphate biosynthesis. *Arch. Microbiol.* **184**:41-48.
- Gottschalk, G. (1968)** The stereospecificity of the citrate synthase in sulfate-reducing and photosynthetic bacteria. *Eur. J. Biochem.* **5**:346-351.
- Gottschalk, G. (1969)** Partial purification and some properties of the (R)-citrate synthase from *Clostridium acidurici*. *Eur. J. Biochem.* **7**:301-306.
- Gottschalk, G., and Barker, H. A. (1966)** Synthesis of glutamate and citrate by *Clostridium kluyveri*. A new type of citrate synthase. *Biochemistry* **5**:1125-1133.
- Gottschalk, G., and Barker, H. A. (1967)** Presence and stereospecificity of citrate synthase in anaerobic bacteria. *Biochemistry* **6**:1027-1034.

**Grayling, R. A., Bailey, K. A. and Reeve, J. N. (1997)** DNA binding and nuclease protection by the HMF histones from the hyperthermophilic archaeon *Methanothermobacter fervidus*. *Extremophiles* **1**:79-88.

**Gürster, S. (2007)** *Nanoarchaeum equitans*: Versuche zur Reindarstellung und strukturelle und proteinbiochemische Charakterisierung. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg.

**Hafenbradl, D., Keller, M., Dirmeier, R., Rachel, R., Rossnagel, P., Burggraf, S., Huber, H., and Stetter, K. O. (1996)** *Ferroglobus placidus* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeum that oxidizes Fe<sup>2+</sup> at neutral pH under anoxic conditions. *Arch. Microbiol.* **166**(5):308-314.

**Hannahan, D. (1983)** Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.

**Hansen, T., Oehlmann, M., and Schönheit, P. (2001)** Novel type of glucose-6-phosphate isomerase in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* **183**:3428-3435.

**Hansen, T., Schlichting, B., Felgendreher, M., and Schönheit, P. (2005)** Cupin-type phosphoglucose isomerases (Cupin-PGIs) constitute a novel metal-dependent PGI family representing a convergent line of PGI evolution. *J. Bacteriol.* **187**:1621-1631.

**Hedderich, R. (2004)** Energy-converting [NiFe] hydrogenases from archaea and extremophiles: ancestors of complex I. *J. Bioenerg. Biomembr.* **36**:65-75.

**Herter, S., Farfsing, J., Gad'On, N., Rieder, C., Eisenreich, W., Bacher, A., and Fuchs, G. (2001)** Autotrophic CO<sub>2</sub> fixation by *Chloroflexus aurantiacus*: study of glyoxylate formation and assimilation via the 3-hydroxypropionate cycle. *J. Bacteriol.* **183**:4305-4316.

**Hohn, M. J., Hedlund, B. P., and Huber, H. (2002)** Detection of 16S rRNA sequences representing the novel phylum "Nanoarchaeota": Indication for a world wide distribution in high temperature biotopes. *System. Appl. Microbiol.* **25**:551-554.

**Howard, J. L., and Ridley, S. M. (1990)** Acetyl-CoA carboxylase: a rapid novel assay procedure used in conjunction with the preparation of enzyme from maize leaves. *FEBS* **261**:261-264.

**Howell, D. M., Xu, H., and White, R. H. (1999)** (R)-Citramalate Synthase in methanogenic archaea. *J. Bacteriol.* **181**:331-333.

**Huber, H., Burggraf, S., Mayer, T., Wyschkony, I., Rachel, R., and Stetter, K. O. (2000)** *Ignicoccus* gen. nov., a novel genus of hyperthermophilic, chemolithoautotrophic Archaea, represented by two new species, *Ignicoccus islandicus* sp. nov. and *Ignicoccus pacificus* sp. nov.. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:2093-2100.

**Huber, H., Hohn, M. J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V. C., and Stetter, K. O. (2002)** A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**:63-67.

**Huber, H., Hohn, M. J., Stetter, K. O., and Rachel, R. (2003)** The phylum Nanoarchaeota: present knowledge and future perspectives of a unique form of life. *Res. Microbiol.* **154**:165-171.

- Huber, R., Wilharm, T., Huber, D., Trincone, A., Burggraf, S., König, H., Rachel, R., Rockinger, I., Fricke, H., and Stetter, K. O. (1992)** *Aquifex pyrophilus* gen. nov., sp. nov., represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**:340–351.
- Hügler, M., Huber, H., Stetter, K. O., and Fuchs, G. (2003)** Autotrophic CO<sub>2</sub> fixation pathways in archaea (Crenarchaeota). *Arch. Microbiol.* **179**:160-173.
- Hügler, M., Menendez, C., Schägger, H., and Fuchs, G. (2002)** Malonyl-coenzyme A reductase from *Chloroflexus aurantiacus*, a key enzyme of the 3-hydroxypropionate cycle for autotrophic CO<sub>2</sub> fixation. *J. Bacteriol.* **184**:2404-2410.
- Hügler, M., Wirsén, C.O., Fuchs, G., Taylor, C.D., and Sievert, S.M. (2005)** Evidence for autotrophic CO<sub>2</sub> fixation via the reductive tricarboxylic acid cycle in members of the  $\epsilon$ -Proteobacteria. *J. Bacteriol.* **187**:3020-3027.
- Imanaka H., Yamatsu, A., Fukui, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2006)** Phosphoenolpyruvate synthase plays an essential role for glycolysis in the modified Embden-Meyerhof pathway in *Thermococcus kodakarensis*. *Mol. Microbiol.* **61**:898-909.
- Ivanovsky, R. N., Sintov, N. V., and Kondratieva, E. N. (1980)** ATP-linked citrate lyase activity in the green sulfur bacterium *Chlorobium limicola* former *Thiosulfatophilum*. *Arch. Microbiol.* **128**:239-241.
- Jahn, U. (2003)** Physiologische, molekularbiologische und biochemische Untersuchungen am Organismensystem *Nanoarchaeum equitans* und *Ignicoccus* sp. KIN4/I. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg.
- Jahnke, L. L., Eder, W., Huber, R., Hope, J. M., Hinrichs, K., Hayes, J. M., Des Marais, D. J., Cady, S., and Summons, R. (2001)** Signature lipids and stable carbon isotope analysis of octopus spring hyperthermophilic communities compared with those of *Aquificales* representatives. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5179-5189.
- Kaim, G., and Dimroth, P. (1998)** Voltage generated torque drives the motor of the ATP synthase. *EMBO J.* **17**:5887-5895.
- Kaim G, and Dimroth P. (1999)** ATP-Synthesis by F-type ATP synthase is obligatorily dependent on the transmembrane voltage. *EMBO J.* **18**:4118-4127.
- Kaine, B. P., Gupta, R., and Woese, C. R. (1983)** Putative introns in tRNA genes of prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**(11):3309-3312.
- Kates, M. (1986)** Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids. In: Bubon, R. H., and van Knippenberg, P. H. (Eds); *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands.
- Kates, M. (1993)** Membrane lipids of archaea. In: Kates, M. et al. (Eds); *The Biochemistry of Archaea (Archeobacteria)*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands.
- Kates, M. (1997)** Diether and tetraether phospholipids and glycolipids as molecular markers for Archeobacteria (Archaea). In: Eganhouse, R. P. (Ed); *Molecular markers in environmental geochemistry*. ACC Symposium series, Vol. 671, American Chemical Society, Washington DC, USA.
- Kato, N., Yurimoto, H., and Thauer, R. K. (2006)** The physiological role of the ribulose monophosphate pathway in bacteria and archaea. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**:10-21.

- Klenk, H. P., Clayton, R. A., Tomb, J. F., White, O., Nelson, K. E., Ketchum, K. A., Dodson, R. J., Gwinn, M., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Richardson, D. L., Kerlavage, A. R., Graham, D. E., Kyrpides, N. C., Fleischmann, R. D., Quackenbush, J., Lee, N. H., Sutton, G. G., Gill, S., Kirkness, E. F., Dougherty, B. A., McKenney, K., Adams, M. D., Loftus, B., Peterson, S., Reich, C. I., McNeil, L. K., Badger, J. H., Glodek, A., Zhou, L., Overbeek, R., Gocayne, J. D., Weidman, J. F., McDonald, L., Utterback, T., Cotton, M. D., Spriggs, T., Artiach, P., Kaine, B. P., Sykes, S. M., Sadow, P. W., D'Andrea, K. P., Bowman, C., Fujii, C., Garland, S. A., Mason, T. M., Olsen, G. J., Fraser, C. M., Smith, H. O., Woese, C. R., and Venter, J. C. (1997) The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**(6658):364-370.
- Koga, Y., Nishihara, M., Morii, H., and Akagawa-Matsushita, M. (1993) Ether polar lipids of methanogenic bacteria: structures, comparative aspects, and biosynthesis. *Microbiol. Rev.* **57**:164–182.
- Kon, T., Nemoto, N., Oshima, T., and Yamagishi, A. (2002) Effects of a squalene epoxidase inhibitor, terbinafine, on ether lipid biosyntheses in a thermoacidophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum*. *J. Bacteriol.* **184**(5):1395-1401.
- Kurr, M., Huber, R., König, H., Jannasch, H. W., Fricke, H., Trincone, A., Kristjansson, J. K., and Stetter, K. O. (1991) *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov., represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C. *Arch. Microbiol.* **156**: 239–247.
- Lämmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Langworthy, T. A. (1985) Archaeobacteria. In: Woese, C. R., and Wolfe, R. S. (Eds); *The Bacteria*, Vol. VIII, Academic Press, New York N Y, USA.
- Ljungdahl, L., Irion, E., and Wood, H. G. (1965) Total synthesis of acetate from CO<sub>2</sub>. I. Co-methylcobyrinic acid and CO-(methyl)-5-methoxybenzimidazolylcobamide as intermediates with *Clostridium thermoaceticum*. *Biochemistry* **4**(12):2771-2780.
- Ljungdahl, L. G. (1986) The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**:415-450.
- Luger, K., and Richmond, T. J. (1998) DNA binding within the nucleosome core. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**:33-40.
- Madigan, M., and Martinko, J. (2006) *Brock Biology of Microorganisms*, 11th ed., Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, USA.
- Makarova, K. S., and Koonin, E. V. (2003) Comparative genomics of Archaea: how much have we learned in six years, and what's next? *Genome Biol.* **4**(8):115.
- McCliment, E. A., Voglsonger, K. M., O'Day, P. A., Dunn, E. E., Holloway, J. R., and Cary, S. C. (2006) Colonization of nascent, deep-sea hydrothermal vents by a novel Archaeal and Nanoarchaeal assemblage. *Environ. Microbiol.* **8**:114-125.
- Menendez, C., Bauer, Z., Huber, H., Gad'on, N., Stetter, K. O., and Fuchs, G. (1999) Presence of acetyl coenzyme A (CoA) carboxylase and propionyl-CoA carboxylase in autotrophic Crenarchaeota and indication for operation of a 3-hydroxypropionate cycle in autotrophic carbon fixation. *J. Bacteriol.* **181**:1088-1098.
- Miller, J. H., (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.



- Muscholl, A., Galli, D., Wanner, G., and Wirth, R. (1993)** Sex pheromone plasmid paD1-encoded aggregation substance of *Enterococcus faecalis* is positively regulated in trans by traE1. *Eur. J. Biochem.* **214**:333-338.
- Näther, D., and Rachel, R. (2004)** The membrane of the hyperthermophilic archaeon *Ignicoccus*: dynamics, ultrastructure and composition. *Biochem. Soc. Trans.* **32**:199-203.
- Nemoto, N., Shida, Y., Shimada, H., Oshima, T., and Yamagishi, A. (2003)** Characterization of the precursor of tetraether lipid biosynthesis in the thermoacidophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *Extremophiles* **7**(3):235-243.
- Nishihara, M., and Koga, Y. (1987)** Extraction and composition of polar lipids from the archaeobacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum*: effective extraction of tetraether lipids by an acidified solvent. *J. Biochem.* **101**:997-1005.
- Nishimasu, H., Fushinobu, S., Shoun, H., and Wakagi, T. (2004)** The first crystal structure of the novel class of fructose-1,6-bisphosphatase present in thermophilic archaea. *Structure* **12**:949-959.
- Ochman, H., and Moran, N. A. (2001)** Genes lost and found: Evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science* **292**:1096-1098.
- Paper, W. (2005)** Wachstumsuntersuchungen und physiologische Charakterisierungen des Organismensystems *Nanoarchaeum equitans* und *Ignicoccus* sowie der Anreicherungskultur CU1. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg.
- Paper, W., Jahn, U., Hohn, M. J., Kronner, M., Näther, D. J., Burghardt, T., Rachel, R., Stetter, K. O., and Huber, H. (2007)** *Ignicoccus hospitalis* sp. nov., the host of '*Nanoarchaeum equitans*'. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* **57**:803-808.
- Patel, H. M., Kraszewski, J. L., and Mukhopadhyay, B. (2004)** The phosphoenolpyruvate carboxylase from *Methanothermobacter thermoautotrophicus* has a novel structure. *J. Bacteriol.* **186**:5129-5137.
- Pereira, S. L., Grayling, R. A., Lurz, R., and Reeve, J. N. (1997)** Archaeal nucleosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**(23):12633-12637.
- Rachel, R., Wyschkony, I., Riehl, S., and Huber, H. (2002)** The ultrastructure of *Ignicoccus*: evidence for a novel outer membrane and for intracellular vesicle budding in an archaeon. *Archaea* **1**:9-18.
- Ragsdale, S. W. (1991)** Enzymology of the acetyl-CoA pathway of CO<sub>2</sub> fixation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **26**(3-4):261-300.
- Rajagopalan, R., and Altekari, W. (1994)** Characterisation and purification of ribulose-bisphosphate carboxylase from heterotrophically grown halophilic archaeobacterium, *Haloferax mediterranei*. *Eur. J. Biochem.* **221**(2):863-869.
- Randau, L., Calvin, K., Hall, M., Yuan, J., Podar, M., Li, H., and Söll, D. (2005b)** The heteromeric *Nanoarchaeum equitans* splicing endonuclease cleaves noncanonical bulge-helix-bulge motifs of joined tRNA halves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**(50):17934-17939.
- Randau, L., Münch, R., Hohn, M. J., Jahn, D., and Söll, D. (2005a)** *Nanoarchaeum equitans* creates functional tRNAs from separate genes for their 5'- and 3'-halves. *Nature* **433**(7025):537-541.

- Rashid, N., Imanaka, H., Kanai, T., Fukui, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2002)** A novel candidate for the true fructose-1,6-bisphosphatase in archaea. *J. Biol. Chem.* **277**:30649-30655.
- Ronimus, R. S., and Morgan, H. W. (2003)** Distribution and phylogenies of enzymes of the Embden-Meyerhof-Parnas pathway from archaea and hyperthermophilic bacteria support a gluconeogenic origin of metabolism. *Archaea* **1**:199-221.
- Rütters, H., Sass, H., Cypionka, H., and Rulíkötter, J. (2001)** Monoalkylether phospholipid in the sulfate-reducing bacteria *Desulfosarcina variabilis* and *Desulforhabdus amnigenus*. *Arch. Microbiol.* **176**:435-442.
- Sandman, K., Grayling, R. A., Dobrinski, B., Lurz, R., and Reeve, J. N. (1994)** Growth phase dependent synthesis of histones in the archaeon *Methanothermus fervidus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:12624-12628.
- Sandman, K., and Reeve, J. N. (1998)** Origin of the eukaryotic nucleus. *Science* **280**:501-503.
- Sandman, K., and Reeve, J. N. (2000)** Structural and functional relationships of archaeal and eukaryal histones and nucleosomes. *Arch. Microbiol.* **173**:165-169.
- Sandman, K., Zhu, W., Summers, M. F., and Reeve, J. N. (1998)** Evolution of the histone fold. In: Weigel, J., and Adams, M. W. W. (Eds); *Thermophiles: the keys to molecular evolution and the origin of life?* Taylor and Francis, London.
- Sato, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2007)** Archaeal Type III RuBisCOs function in a pathway for AMP metabolism. *Science* **315**:1003-1006.
- Schäfer, S., Götz, M., Eisenreich, W., Bacher, A., and Fuchs, G. (1989)** <sup>13</sup>C-NMR study of autotrophic CO<sub>2</sub> fixation in *Thermoproteus neutrophilus*. *Eur. J. Biochem.* **184**:151-156.
- Schauder, R., Widdel, F., and Fuchs, G. (1987)** Carbon assimilation pathway in sulphate reducing bacteria. II. Enzymes of a reductive citric acid cycle in the autotrophic *Desulfobacter hydrogenophilus*. *Arch. Microbiol.* **148**:218-225.
- Selkov, E., Maltsev, N., Olsen, G. J., Overbeek, R., and Whitman, W. B. (1997)** A reconstruction of the metabolism of *Methanococcus jannaschii* from sequence data. *Gene* **197**:GC11-26.
- Shiba, H., Kawasumi, T., Igarashi, Y., Kodama, T., and Minoda, Y. (1985)** The CO<sub>2</sub> assimilation via the reductive tricarboxylic acid cycle in an obligately autotrophic, aerobic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus*. *Arch. Microbiol.* **141**:198-203.
- Siebers, B., and Schönheit, P. (2005)** Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in Archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:695-705.
- Slesarev, A. I., Belova, G. I., Kozyavkin, S. A., and Lake, J. A. (1998)** Evidence for an early procaryotic origin of histones H2A and H4 prior to the emergence of eukaryotes. *Nucl. Acids Res.* **26**(2):427-430.
- Smith, D. C., and Douglas, A. E. (1987)** *The biology of Symbiosis*. Edward Arnold, London, Victoria, Baltimore.
- Soderberg, T. (2005)** Biosynthesis of ribose-5-phosphate and erythrose-4-phosphate in archaea: a phylogenetic analysis of archaeal genomes. *Archaea* **1**:347-352.

- Soares, D. J., Marc, F., and Reeve, J. N. (2003)** Conserved Eukaryotic Histone-Fold Residues Substituted into an Archaeal Histone Increase DNA Affinity but Reduce Complex Flexibility. *J. Bacteriol.* **185**(11):3453-3457.
- Sprott, G. D., Meloche, M., Richards, J. C. (1991)** Proportions of diether, macrocyclic diether, and tetraether lipids in *Methanococcus jannaschii* grown at different temperatures. *J. Bacteriol.* **173**(12):3907-3910.
- Sprott, G. D., Tolson, D. L., and Patel, G. B. (1997)** Archaeosomes as novel antigen delivery systems. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**(1):17-22.
- Starich, M. R., Sandman, K., Reeve, J. N., and Summers, M. F. (1996)** NMR structure of HMfB from the hyperthermophile, *Methanothermus fervidus*, confirms that this archaeal protein is a histone. *J. Mol. Biol.* **255**:187-203.
- Stern, J. R., and Bambers, G. (1966)** Glutamate biosynthesis in anaerobic bacteria. I. Citrate synthetase pathway of glutamate synthesis in *Clostridium kluyveri*. *Biochemistry* **5**: 1113-1118.
- Stetter, K. O., König, H., and Stackebrand, E. (1983)** *Pyrodictium* gen. nov., a new genus of submarine disc-shaped sulphur reducing archaeobacteria growing optimally at 105 °C. *System. Appl. Microbiol.* **4**:535-551.
- Strauss, G., and Fuchs, G. (1993)** Enzymes of a novel autotrophic CO<sub>2</sub> fixation pathway in the phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*, the 3-hydroxypropionate cycle. *Eur. J. Biochem.* **215**:633–643.
- Sturt, H. F., Summons, R. E., Smith, K., Elvert, M., and Hinrichs, K. U. (2004)** Intact polar membrane lipids in prokaryotes and sediments deciphered by high-performance liquid chromatography / electrospray ionization multistage mass spectrometry – new biomarkers for biogeochemistry and microbial ecology. *Rapid Comm. Mass. Spectrom.* **18**(6):617-628.
- Sugai, A., Sakuma, R., Fukuda, I., Kurosawa, N., Itoh, Y. H., Kon, K., Ando, S., Itoh, T. (1995)** The structure of the core polyol of the ether lipids from *Sulfolobus acidocaldarius*. *Lipids* **30**(4):339-344.
- Sullivan, S., Daniel, W. S., Kenneth, L. T., Makalowska, I., Taylor, P. M., Baxeavanis, A. D., and Landsman, D. (2002)** The Histone Database. *Nucl. Acids Res.* **30**:341-342.
- Summons, R. E., Franzman, P. D., and Nichols, P. D. (1998)** Carbon isotopic fractionation associated with methylotrophic methanogenesis. *Org. Geochem.* **28**:465-475.
- Tersteegen, A., Linder, D., Thauer, R. K., and Hedderich, R. (1997)** Structures and functions of four anabolic 2-oxoacid oxidoreductases in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Eur. J. Biochem.* **244**:862-868.
- Thauer, R. K., Möller-Zinkhan, D., and Spormann, A. M. (1989)** Biochemistry of acetate catabolism in anaerobic chemotrophic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**:43-67.
- Tumbula, D. L., Teng, Q., Bartlett, M. G., and Whitman, W. B. (1997)** Ribose biosynthesis and evidence for an alternative first step in the common aromatic amino acid pathway in *Methanococcus maripaludis*. *J. Bacteriol.* **179**(19):6010-6013.
- Umbarger, H. E. (1978)** Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **47**:533-606.

- Verhees, C. H., Huynen, M. A., Ward, D. E., Schiltz, E., de Vos, W. M., and van der Oost, J. (2001)** The phosphoglucose isomerase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* is a unique glycolytic enzyme that belongs to the cupin superfamily. *J. Biol. Chem.* **276**:40926-40932.
- Verhees, C. H., Kengen, S. W. M., Tuininga, J. E., Schut, G. J., Adams, M. W. W., de Vos, W. M., and van der Oost, J. (2003)** The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *Biochem. J.* **375**:231-246.
- Vogel, H. J. (1965)** Lysine biosynthesis and evolution. In: Bryson, V. (Ed); *Evolving genes and proteins*. Academic Press, New York.
- Vorholt, J. A. (2002)** Cofactor-dependent pathway of formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria. *Arch. Microbiol.* **178**:239-249.
- Vorholt, J. A., Hafenbradl, D., Stetter, K. O., and Thauer, R. K. (1997)** Pathways of autotrophic CO<sub>2</sub> fixation and of dissimilatory nitrate reduction to N<sub>2</sub>O in *Ferroglobus placidus*. *Arch. Microbiol.* **167**(1):19-23.
- Vorholt, J. A., Kunow, J., Stetter, K. O., and Thauer, R. K. (1995)** Enzymes and coenzymes of the carbon monoxide dehydrogenase pathway for autotrophic CO<sub>2</sub> fixation in *Archaeoglobus lithotrophicus* and the lack of carbon monoxide dehydrogenase in the heterotrophic *A. profundus*. *Arch. Microbiol.* **163**(2):112-118.
- Waters, E., Hohn, M. J., Ahel, I., Graham, D. E., Adams, M. D., Barnstead, M., Beeson, K. Y., Bibbs, L., Bolanos, R., Keller, M., Kretz, K., Lin, X., Mathur, E., Ni, J., Podar, M., Richardson, T., Sutton, G. G., Simon, M., Söll, D., Stetter, K. O., Short, J. M., and Noordewier, M. (2003)** The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:12984-12988.
- Weimer, P. J., and Zeikus, J. G. (1979)** Acetate assimilation pathway of *Methanosarcina barkeri*. *J. Bacteriol.* **137**(1):332-339.
- White, D. (1995)** *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes* 3<sup>rd</sup> ed. Oxford University Press, USA.
- White, M. F., and Bell, S. D. (2002)** Holding it together: chromatin in the Archaea. *Trends in Genetics* **18**(12):621-625.
- White, R. H. (2004)** L-Aspartate semialdehyde and a 6-deoxy-5-ketohexose 1-phosphate are the precursors to the aromatic amino acids in *Methanocaldococcus jannaschii*. *Biochemistry* **43**:7618-7627.
- Wood, H. G. (1991)** Life with CO or CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> as a source of carbon and energy. *FASEB J.* **5**(2):156-163.
- Yu, J. P., Ladapo, J., and Whitman, W. B. (1994)** Pathway of glycogen metabolism in *Methanococcus maripaludis*. *J. Bacteriol.* **176**:325-332.
- Yurimoto, H., Kato, N., and Sakai, Y., (2005)** Assimilation, dissimilation, and detoxification of formaldehyde, a central metabolic intermediate of methylotrophic metabolism. *Chem. Rec.* **5**:367-375.
- Zabriskie, T., and Jackson, M. (2000)** Lysine biosynthesis and metabolism in fungi. *Nat. Prod. Rep.* **17**:85-97.

## VII. Anhang

### Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
bp	Basenpaare
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Rinderserumalbumin (Beef Serum Albumine)
BSTFA	N.O-(bis[Trimethylsilyl]trifluoroacetamid)
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dTTP	Desoxythimidin-5'-triphosphat
Da	Dalton
DTE	Dithioerythritol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
F (Primer)	Forward
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (liquid chromatography – mass spectrometry)
Lsg.	Lösung
min	Minute
NAD(P)	Nicotin-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat)
O.D.	optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEP	Phosphoenolpyruvat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R (Primer)	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SME	Synthetisches Meerwasser
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCMS	Trimethylchlorsilan
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÜN	über Nacht
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)

**Symbole für den Nukleinsäurecode:**

A	Desoxyadenosin
C	Desoxycytidin
D	Desoxyguanosin
T	Desoxythimidin

**Symbole für die Aminosäuren :**

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

### Danksagung :

**Herrn Prof. Michael Thomm** möchte ich für die freundliche Aufnahme an seinem Lehrstuhl und für die Betreuung dieser Doktorarbeit danken. Die hervorragenden Arbeitsbedingungen an seinem Institut, seine Unterstützung und seine wertvollen Anregungen trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

**Dr. Harald Huber** möchte ich für die freundliche Aufnahme in sein Labor und die Vergabe dieses Themas danken. Er hatte jederzeit für Fragen oder Probleme ein offenes Ohr und hilfreiche Ratschläge und Kontakte parat.

**PD. Reinhard Rachel** danke ich für seine wertvollen Ratschläge, zahllose wissenschaftliche Diskussionen und seine Begeisterung für meine Arbeit und die Cokultur Kin4/M im Allgemeinen.

Ein herzlicher Dank geht an **Prof. Karl O. Stetter** für die schon in der Diplomarbeit geweckte Begeisterung für Archaeen im Allgemeinen und das Organismensystem *I. hospitalis* und *N. equitans* im Speziellen.

Die Stoffwechselanalysen entstanden in Zusammenarbeit mit **Prof. Georg Fuchs**, Freiburg, und **Dr. Wolfgang Eisenreich**, München. Bei beiden möchte ich mich herzlich für die freundliche Aufnahme und Betreuung in ihren Instituten, sowie für den großen Lerneffekt für mich während dieser Kooperation bedanken. Dank gilt auch ihren Mitarbeitern: **Christine Schwarz** für die Arbeit am NMR, **Michael Hügler** für die Einweisung in die Methodiken der Enzymtests, und **Rafael Say** für die Hilfe bei Genomanalysen.

Die Lipidanalysen entstanden in Kooperation mit Prof. **Roger Summons** am Massachusetts Institute of Technology. Ich möchte mich herzlich für diese Zusammenarbeit und den schönen und produktiven Aufenthalt in seinem Institut bedanken.

Danke auch an **Prof. John Reeve** für sein Interesse und wertvolle Tipps bezüglich der zu den Analysen der Histone von *N. equitans*.

Ein herzliches Dankeschön gilt den Männern der Fermentation, **Thomas Hader** und **Konrad Eichinger**. Eure tatkräftige Unterstützung beim Massenkultivieren war sehr wertvoll und ich habe mich immer gerne bei Euch im Keller aufgehalten.

Vielen Dank an **Elisabeth Nagelfeld** für die große Hilfe bei allen verwaltungstechnischen Fragen und das wohlwollende Tolerieren meiner völligen Unkenntnis bürokratischer Vorgänge.

Ein herzliches Dankeschön geht an **Gabi Gmeinwieser** - Bürokollegin, Lieblings-Tratschtante, Laborseele und Helfer in jeglicher Not. Auch bei **Kerstin Roth** und **Veronika Menath** möchte ich mich sehr für die gute Zusammenarbeit, viele nette Gespräche und die schöne Zeit im Labor bedanken.

Danke auch an meine Lieblingsdiplomanden, **Walter Paper**, **Michael Schnitzbauer**, **Kristina Beblo**, **Ulf Küper**, **Johanna Hlady** und **Martin Gallenberger**, für diverse wissenschaftliche und unwissenschaftliche Gespräche, viel Spaß und die schöne Zeit.

Herzlicher Dank gilt den stets hilfsbereiten und freundlichen Kollegen am Lehrstuhl.

Vielen Dank an alle Korrekturleser dieser Arbeit.

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, und nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet haben. Diese Arbeit war bisher nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens. Andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

Teilergebnisse dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht worden:

**Jahn, U., Summons, R., Sturt, H., Grosjean, E., and Huber, H. (2004)** Composition of the lipids of *Nanoarchaeum equitans* and their origin from its host *Ignicoccus* sp. strain KIN4/I. Arch. Microbiol. **182(5)**:404-413.

**Paper, W., Jahn, U., Hohn, M. J., Kronner, M., Näther, D. J., Burghardt, T., Rachel, R., Stetter, K. O., and Huber, H. (2007)** *Ignicoccus hospitalis* sp. nov., the host of '*Nanoarchaeum equitans*'. Int. J. System. Evol. Microbiol. **57**:803-808.

**Jahn, U., Huber, H., Eisenreich, W., Hügler, M., and Fuchs, G. (2007)** Insights into the Autotrophic CO<sub>2</sub> Fixation Pathway of the Archaeum *Ignicoccus hospitalis* - A Comprehensive Analysis of the Central Carbon Metabolism. J. Bacteriol. **189(11)**:4108-4119.

Regensburg, Mai 2007